

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia



**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE INFECÇÕES POR *NEISSERIA GONORRHOEAE* E  
PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

Alexandra Cristina Domingos Rodrigues

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto e coorientada  
pelo Dr. António Carlos Silva Cardoso

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

Lisboa, Novembro de 2017

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia



**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES POR *NEISSERIA GONORRHOEAE* E  
PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

Alexandra Cristina Domingos Rodrigues

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto e coorientada  
pelo Dr. António Carlos Silva Cardoso

**MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS**

Lisboa, Novembro de 2017

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo de várias pessoas, às quais gostaria de expressar algumas palavras de agradecimento, em particular:

Ao meu orientador, Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto, pelo apoio incondicional e disponibilidade, bem como pelas palavras de incentivo e motivação ao longo da realização da dissertação.

Ao Dr. Joaquim Chaves, Laboratório de Análises Clínicas, e em particular ao meu coorientador, Dr. António Carlos Silva Cardoso, por me ter dado a oportunidade de realizar este projeto no laboratório e pelo apoio prestado.

Ao Doutor João Paulo Gomes e ao Dr. Miguel Pinto do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) pela colaboração na realização da sequenciação total do genoma e pela disponibilidade demonstrada ao longo do trabalho.

Aos meus colegas do departamento de microbiologia pelo seu contributo e apoio.

Por último, mas não menos importante, à minha família e amigos que em momentos mais difíceis contribuíram sempre com carinho, compreensão e incentivo a fim prosseguir com a realização desta dissertação.

## Resumo

*Neisseria gonorrhoeae* é uma bactéria que infeta exclusivamente o Homem, transmite-se por contacto sexual e é responsável pela gonorreia, que se caracteriza por uretrite, cervicite, faringite ou proctite.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as infeções gonocócicas representam 78 milhões dos cerca de 357 milhões de novos casos de infeções sexualmente transmissíveis (ISTs) curáveis que ocorrem em todo o mundo a cada ano.

Para além da elevada incidência de infeções por *N. gonorrhoeae*, esta bactéria evidencia uma capacidade extraordinária de desenvolver resistências a múltiplas classes de antibióticos, este processo de resistência é mediado quer por cromossomas quer por plasmídeos.

Na primeira parte deste estudo foi analisada a frequência de infeções gonocócicas e o perfil de resistências numa população de utentes que recorreu a um laboratório de ambulatório entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2016.

Foram analisadas um total de 163 976 amostras e obtiveram-se 444 (0,27%) amostras positivas para *N. gonorrhoeae* com uma maior frequência de infeções no homem (0,22%) do que na mulher (0,05%). Os dados do estudo revelaram um aumento do número de infeções gonocócicas de 2007 (20 casos - 0,12%) para 2016 (92 casos - 0,57%) e evidenciaram que as infeções ocorreram em maior número no grupo etário dos 20-24 anos.

O estudo de suscetibilidade realizado nas 444 amostras positivas para a *N. gonorrhoeae* demonstrou um aumento evidente da resistência quer à Ciprofloxacina (45% para 70%) como à Penicilina (65% para 83%) de 2007 para 2016, respetivamente. No que se refere à Ceftriaxona, não foram encontradas resistências.

Adicionalmente ao estudo anterior, foram investigadas possíveis alterações ao nível genético que possam ocorrer em *N. gonorrhoeae* após a transmissão entre parceiros sexuais e durante o processo de infeção homem/mulher, tendo em conta as diferentes características inerentes aos hospedeiros dos dois géneros. Para realizar este estudo foi aplicada a técnica de sequenciação total do genoma (*Whole Genome Sequencing* – WGS).

A análise da sequência genética total do cromossoma de cada estirpe confirmou que os parceiros estavam infetados com a mesma estirpe de *N. gonorrhoeae*. A comparação dos genomas totais de cada par de parceiros revelou a inexistência de perda ou ganho de material genético. No entanto, foi possível observar diferenças genéticas sob a forma de mutações pontuais quando se comparou as estirpes dos mesmos parceiros. Estes resultados indicam a possibilidade de haver genes que a bactéria necessita de modificar de forma a se adaptar a ambientes diferentes durante o processo de infeção homem/mulher para promover a sua sobrevivência.

**Palavras Chave:** *Neisseria gonorrhoeae*, gonorreia, teste de suscetibilidade, sequenciação de nova geração

**Abstract**

*Neisseria gonorrhoeae* is a bacterium that infects only human, transmitted by sexual contact and responsible for gonorrhea, which is characterized by urethritis, cervicitis, proctitis or pharyngitis.

According to the World Health Organization, the gonococcal infections represent 78 million of about 357 million new cases of curable sexually transmitted infections (STIs) that occur each year around the world.

In addition to the high incidence of infections by *N. gonorrhoeae*, these bacteria shows extraordinary capacity to develop resistance to multiple classes of antibiotics, this process is mediated either by chromosomes or plasmids.

In the first part of this study it was analyzed the frequency of gonococcal infections and the profile of resistance in a population of outpatient laboratory users between January 2007 and December 2016.

A total of 163 976 samples were analyzed and 444 positive samples were obtained (0.27%) for *N. gonorrhoeae*, with an increased frequency of infections in men's (0.22%) than in women (0.05%). The data of the study revealed a significant increase in the number of gonococcal infections in 2007 (20 cases-0.12%) for 2016 (92 cases-0.57%) and showed that the infections occurred in greater numbers in the age group of 20-24 years.

The susceptibility study performed in 444 positive samples for *N. gonorrhoeae* showed a clear increase of resistance to Ciprofloxacin (45% to 70%) to penicillin (65% to 83 %) from 2007 to 2016, respectively. With regard to the Ceftriaxone, resistance was not found.

In addition to the previous study, it was intended to investigate possible changes at the genetic level that may occur in *N. gonorrhoeae* after transmission between sexual partners and to the effect it was applied the *Whole Genome Sequencing* – WGS technique.

The analysis of the total genetic sequence of chromosome of each strain confirmed that the partners were infected with the same strain of *N. gonorrhoeae*. Comparison of total genomes of each pair of partners revealed that there is no loss or gain of genetic material. However, it was possible to observe genetic differences in the form of point mutations when compared strains of the same partners. These results indicate the possibility of genes that the bacteria need to change in order to adapt to different environments during the infection process man/woman to promote their survival.

**Keywords** - *Neisseria gonorrhoeae*, gonorrhea, susceptibility test, next-generation sequencing.

## Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 ASPETOS HISTÓRICOS ASSOCIADOS À DESCOBERTA DA <i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i>	1
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	1
1.2.1 PATOGENICIDADE	2
1.2.1.1 Fatores de virulência	2
1.2.1.1.1 Pili do tipo IV	2
1.2.1.1.2 Lipoligossacarídeo (LOS)	3
1.2.1.1.3 Porinas (Por) - Proteína I	3
1.2.1.1.4 Proteínas de Opacidade (Opa) - Proteína I I	4
1.2.1.1.5 Proteína Rpm – Proteína III	5
1.2.1.1.6 Proteína Fbp	5
1.2.1.1.7 Proteína H8	5
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À INFEÇÃO GONOCÓCICA	5
1.4 DIAGNÓSTICO	7
1.4.1 SEQUENCIAÇÃO DE NOVA GERAÇÃO	9
1.5 EPIDEMIOLOGIA	9
1.5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS EM PORTUGAL	12
1.6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM <i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i>	14
1.6.1 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	15
1.6.2 EPIDEMIOLOGIA DAS RESISTÊNCIAS ANTIMICROBIANAS EM <i>N. GONORRHOEAE</i>	16
1.7 TRATAMENTO	18
1.7.1 INVESTIGAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIMICROBIANOS – TERAPÊUTICAS DO FUTURO	22
<b>2 - JUSTIFICAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>

<b>3.1 CARATERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO</b>	<b>25</b>
<b>3.2 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS</b>	<b>26</b>
<b>3.3 CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE NEISSERIA GONORRHOEAE</b>	<b>26</b>
<b>3.4 ESTUDO DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS</b>	<b>26</b>
<b>3.5 ESTUDO GENÉTICO DE ESTIRPES PROVENIENTES DE PARES DE PARCEIROS SEXUAIS</b>	<b>27</b>
<b>3.6 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS</b>	<b>27</b>
 <b>4 – RESULTADOS</b>	 <b>28</b>
<b>4.1 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS TOTAIS RELATIVAMENTE AO GÉNERO</b>	<b>28</b>
<b>4.2 FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES GONOCÓCICAS</b>	<b>29</b>
4.2.1 FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES GONOCÓCICAS POR GÉNERO	29
4.2.2 FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES GONOCÓCICAS POR GRUPO ETÁRIO	31
4.2.3 FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES GONOCÓCICAS POR GÉNERO E GRUPO ETÁRIO	31
<b>4.3 ESTUDO DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS</b>	<b>33</b>
<b>4.4 ESTUDO GENÉTICO DAS ESTIRPES PROVENIENTES DE PARES DE PARCEIROS SEXUAIS</b>	<b>34</b>
4.4.1 SELEÇÃO DE PARCEIROS SEXUAIS DOS UTENTES COM INFEÇÃO GONOCÓCICA	34
4.4.2 SEQUENCIAÇÃO TOTAL DO GENOMA DAS ESTIRPES DOS PARES DE PARCEIROS SEXUAIS	35
 <b>5 – CONCLUSÕES E DISCUSSÃO</b>	 <b>39</b>
<b>5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS TOTAIS RELATIVAMENTE AO GÉNERO</b>	<b>39</b>
<b>5.2 FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES GONOCÓCICAS</b>	<b>39</b>
5.2.1 FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES GONOCÓCICAS POR GÉNERO	39
5.2.2 FREQUÊNCIA DE INFEÇÕES GONOCÓCICAS POR GRUPO ETÁRIO E GÉNERO	40
<b>5.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA</b>	<b>40</b>
<b>5.4 SEQUENCIAÇÃO TOTAL DO GENOMA DAS ESTIRPES DOS PARES DE PARCEIROS SEXUAIS</b>	<b>41</b>
<b>5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>42</b>
 <b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	 <b>43</b>
 <b>7 – ANEXOS</b>	 <b>48</b>

**Índice de tabelas**

Tabela 1 - Manifestações clínicas da infeção gonocócica .....	7
Tabela 2 - Número e taxa de casos confirmados reportados por 100 000 habitantes, EU/EEA, 2010-2014.....	12
Tabela 3 - Número de casos notificados de Infeções Gonocócicas, por grupo etário, sexo e ano de notificação, Portugal, 2011-2014 .....	13
Tabela 4 - Falhas de tratamento com ceftriaxona verificadas globalmente (Adaptado de <sup>(33)</sup> ) .....	17
Tabela 5 - Recomendações da OMS para o tratamento de infeções gonocócicas.....	19
Tabela 6 - Terapêutica antimicrobiana recomendada em infeções gonocócicas .....	21
Tabela 7 - Resultados relativos ao NG-MAST .....	35
Tabela 8 - Resultados da sequenciação do par de parceiros ANM .....	36
Tabela 9 - Resultados da sequenciação do par de parceiros PVE .....	37



## Índice de figuras

Figura 1 - Componentes proeminentes da membrana externa de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	3
Figura 2 - Proteína Opa na membrana externa de <i>N. gonorrhoeae</i> .....	4
Figura 3 - Taxa de casos de gonorreia confirmada por 100 000 habitantes, EU/EEA, 2014. 10	
Figura 4 - Taxa de casos de gonorreia confirmada por 100 000 habitantes, por género e idade, EU/EEA, 2014 .....	11
Figura 5 - Número de casos notificados de Infecções Gonocócicas, Portugal, 1950-2014 .....	13
Figura 6 - Distribuição do total de amostras analisadas por género .....	28
Figura 7 - Distribuição do total de amostras analisadas por género e ano, 2007-2016.....	28
Figura 8 - Distribuição das infeções gonocócicas por género, 2007-2016 .....	29
Figura 9 - Comparação da frequência de infeções por <i>N. gonorrhoeae</i> no sexo feminino, no sexo masculino e total (feminino e masculino), 2007-2016 .....	29
Figura 10 - Frequência de infeções por <i>N. gonorrhoeae</i> no sexo masculino, 2007-2016 .....	30
Figura 11 - Frequência de infeções por <i>N. gonorrhoeae</i> no sexo feminino, 2007-2016.....	30
Figura 12 - Comparação da frequência de infeções gonocócicas por grupo etário em 2007 e 2016 .....	31
Figura 13 – Número casos de infeções gonocócicas no sexo masculino por grupo etário, 2007 e 2016.....	32
Figura 14 – Número de casos de infeções gonocócicas no sexo feminino por grupo etário, 2007 e 2016.....	32
Figura 18 - Distribuição da informação dos 36 utentes com infeção gonocócica .....	34

## Lista de Abreviaturas

**AMR** - Resistência antimicrobiana

**CDC** - Centro para Prevenção e Controlo de Doenças – EUA, do inglês *Center for Disease Control and Prevention*

**CLSI** - *Clinical Laboratorial Standard Institute*

**CMI** - Concentração mínima inibitória

**CMI** - Concentração mínima inibitória

**DGS** - Direção Geral de Saúde

**DIP** - Doença inflamatória pélvica

**DNDi** - Iniciativa de drogas para doenças negligenciadas, do inglês *Drugs for Neglected Diseases initiative*

**DNA** Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

**ECDC** - Centro para Prevenção e Controlo de Doenças – Europeu, do inglês *European Center for Disease Control and Prevention*

**EEA** - Área Económica Europeia, do inglês *European Economic Area*

**ESBL** -  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, do inglês *Extended Spectrum Beta-Lactamases*

**Etest®** - Episolometer Test

**EU** - União Europeia, do inglês *European Union*

**EUA** - Estados Unidos da América

**GARDP** - Parceria Global para a Pesquisa e Desenvolvimento de Antibióticos, do inglês *Global Antibiotic Research and Development Partnership*

**GASP** - Programa de Vigilância Antimicrobiana Gonocócica, do inglês *Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme*

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana

**HSH** – Homens que fazem sexo com homens

**IGD** - Infecção gonocócica disseminada

**IM** - Intramuscular

**IST** - Infecção sexualmente transmissível

**LOS** - Lipooligossacarídeo

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**NAAT** - Teste de amplificação de ácidos nucleicos

**NCBI** - National Center for Biotechnology

**NGRC** - *Neisseria gonorrhoeae* resistente cromossomicamente

**NGS** - Sequenciação de nova geração, do inglês *Next Generation Sequencing*

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PBP** - Proteínas de ligação á penicilina, do inglês *penicilin biding protein*

**PorB** - Proteína porina

**PPNG** - *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase, do inglês *penicillinase producing Neisseria gonorrhoeae*

**rRNA** - Ácido ribonucleico ribossômico, do inglês *ribossomal ribonucleic acid*

**TRNG** - *Neisseria gonorrhoeae* resistentes à tetraciclina, do inglês *tetracycline resistant Neisseria gonorrhoeae*

**VPP** - Valor preditivo positivo

**WGS** - Sequenciação total do genoma, do inglês *Whole Genome Sequencing*

**Rmp** - Reduction modificable protein

## 1 – Introdução

### 1.1 Aspectos históricos associados à descoberta da *Neisseria gonorrhoeae*

A gonorreia encontra-se entre as mais antigas doenças humanas conhecidas, havendo referências da uretrite venérea nos escritos chineses, no Velho Testamento bíblico e outras literaturas da antiguidade. O nome gonorreia tem origem no grego e foi Galeno (130-200 d.C.) que assim a denominou – gonorreia (gonos = espermatozóide + rhoia = corrimento), pela confusão do exsudado purulento com esperma <sup>(1)</sup>.

Hipócrates, no século quarto e quinto A.C., referia-se a gonorreia aguda como “estrangúria” (estenose uretral) obtida dos “prazeres de Vénus” <sup>(2)</sup>. Já no século XIX, Hellier (1872), foi o primeiro a observar a presença de microrganismos no exsudado purulento de infecções gonocócicas. Bakei, Finkelstein e Watson Cheyne também fizeram observações semelhantes à de Hellier. Embora já fosse reconhecida como doença sexualmente transmissível no século XIII, a gonorreia só se diferenciou da sífilis em meados do século XIX <sup>(2,3)</sup>. Entretanto, foi em 1879, na Universidade de Breslau (Alemanha) que o médico, Albert Ludwig Sigismund Neisser (1855-1916), observou pela primeira vez, o agente etiológico da gonorreia em exsudados purulentos provenientes do trato genital e da conjuntiva. Seguindo os postulados de Robert Koch (1843-1910), Neisser demonstrou a patogenicidade deste microrganismo em todos os casos clínicos de gonorreia ocular e uretral <sup>(4)</sup>. Porém, foi somente em 1885 que o dermatologista Francês Ernest Bumm (1836-1907), após o isolamento subsequente da bactéria, inoculação em voluntários humanos e novamente o isolamento da mesma em sangue de placenta humano, conseguiu demonstrar a relação causal ou causa-efeito entre o microrganismo e a doença <sup>(4,5)</sup>.

No entanto, o conhecimento a respeito do agente etiológico e da patogenia da doença permaneceu escasso durante oitenta anos. Somente no início dos anos setenta do século passado tem início uma nova era na informação acerca da doença e nos anos noventa ocorre uma revolução considerável no conhecimento da sua biologia molecular. Esta revolução permitiu conhecer mais detalhes sobre a interação microrganismo – hospedeiro, dos mecanismos de doença próprios de *N. gonorrhoeae*, das suas resistências e da associação entre a gonorreia e a infecção pelo HIV <sup>(6)</sup>.

### 1.2 Agente etiológico

*N. gonorrhoeae* é uma bactéria pertencente à família Neisseriaceae, que engloba espécies de *Neisseria sp* e *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, bem como espécies de *Acinetobacter sp* e *Kingella sp*. Os membros desta família são cocos de Gram negativo, que se agrupam aos pares ou em cadeias curtas. Possuem faces adjacentes achatadas, o que lhes confere aparência de grãos de café, feijão ou rins. Todas as espécies colonizam a superfície mucosa dos hospedeiros e algumas são consideradas como flora normal do trato respiratório humano. O gênero *Neisseria* apresenta cerca de 11 espécies associadas a humanos, sendo que exclusivamente duas são patogênicas para o Homem: *N. gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, as outras espécies são normalmente comensais do trato respiratório superior e devido à sua virulência limitada só produzem doenças em indivíduos imunocomprometidos <sup>(7)</sup>. Todas as espécies de *Neisseria sp* são oxidase positiva (oxidam os hidratos de carbono produzindo ácido) e catalase positiva, estas características ajudam na diferenciação de outras espécies morfológicamente similares.

A *N. gonorrhoeae* é um diplococo de Gram negativo, não flagelado, não formador de esporos, encapsulado, aeróbio, com diâmetro entre 0,6 a 1,0 µm, requer humidade (90%), atmosfera de CO<sub>2</sub> (5 a 10%), temperatura entre 35°C a 37°C e pH entre 7,2 a 7,6 para crescimento. É um microrganismo extremamente exigente quanto a nutrientes dos quais o ferro, purinas, pirimidinas, aminoácidos e vitaminas são indispensáveis. O meio apropriado para o seu isolamento é o agar-chocolate com vancomicina, colistina e nistatina (meio de Thayer-Martin)

ou o anterior adicionado de trimetoprim (meio de Thayer-Martin modificado) para inibir também as espécies de *Proteus*. Os antibióticos inibem o crescimento das espécies não patogênicas de *Neisseria* e outras espécies contaminantes e permitem o crescimento de *N. gonorrhoeae*. As amostras de produtos estéreis, como por exemplo sangue, líquido cefalorraquidiano e líquido sinovial devem ser cultivadas em meios livres de antibióticos <sup>(3,8)</sup>.

### 1.2.1 Patogenicidade

A habilidade que a *N. gonorrhoeae* tem em modular os seus antígenos de superfície com elevada rapidez aliada à elevada ocorrência de mutações pontuais no seu cromossoma são a base do seu sucesso como patógeno estritamente humano. Várias moléculas são produzidas pela bactéria para permitir a colonização e/ou infecção do hospedeiro, incluindo adesinas, que são fatores cruciais na colonização inicial da mucosa humana.

A *N. gonorrhoeae* primariamente infecta o epitélio colunar. A ligação ao epitélio mucoso ocorre em 24-48 horas pela penetração do microrganismo entre e através das células epiteliais para chegar ao tecido submucoso. Nesta fase há resposta vigorosa de polimorfonucleares, com descamação do epitélio, desenvolvimento de microabscessos submucosos e formação de corrimento abundante <sup>(9)</sup>.

As mulheres, apesar de serem a maior parte das vezes assintomáticas, são mais suscetíveis à infecção que os homens. Estima-se que o risco de infecção de uma mulher após ter contacto com um homem infetado, num único ato sexual sem proteção, é de aproximadamente 70 a 80%, sendo o risco de infecção num homem, nas mesmas condições, de 20 a 30%. Estes últimos valores aumentam para 60 a 80% depois de 4 ou mais relacionamentos sexuais não protegidos <sup>(10)</sup>.

O sexo anal e oral supõem menor risco de contágio que o vaginal, sendo que, o sexo oral é o que acarreta menor risco. Estima-se que a infecção faríngea ocorra, em cerca de 5% dos homens heterossexuais que praticam sexo oral com mulheres infetadas, 5 a 10% das mulheres heterossexuais que o praticam com homens infetados e entre 10 a 20% dos homens que o praticam com homens <sup>(11)</sup>.

A transmissão da infecção gonocócica ocorre maioritariamente por contacto sexual mas pode também ocorrer por transmissão vertical <sup>(9)</sup>.

#### 1.2.1.1 Fatores de virulência

O fator mais marcante da virulência desta bactéria é precisamente a sua capacidade de modular a expressão dos seus antígenos de superfície tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. Assim, a bactéria pode evadir-se do sistema imunitário do hospedeiro e modular a adesão e invasão de diferentes células. A sua integração nas células epiteliais envolve a integração de vários fatores de virulência nomeadamente os pili, lipoligossacarídeo (LOS), proteína porina, proteína de opacidade, e outras proteínas tais como a Rpm, Fbp, H8 <sup>(12)</sup>.

##### 1.2.1.1.1 Pili do tipo IV

São filamentos flexíveis longos, constituídos por subunidades da proteína pilina de peso molecular 16.5 a 21.5 kDa, e podem estender-se por vários micrómetros a partir da superfície da célula, são codificados pelo gene pilE. Os pili tipo IV estão fortemente relacionados com a virulência dos gonococos e sua capacidade de causar doença. Esta estrutura sofre continuamente variação antígenica, o que presumidamente possibilita a reinfeção em grupos de risco. São os pili do tipo IV que promovem a adesão e fixação no processo de infecção sendo o primeiro fator de virulência no ataque inicial da bactéria às células das mucosas dos tecidos humanos e, somente as bactérias que os possuem, são capazes de produzir infecção. Além da adesão e fixação, os pili estão envolvidos em outras funções nomeadamente na facilitação da captação de DNA estranho do meio extracelular, aumentando a frequência de

transformação da bactéria e mantendo a diversidade genética que sustenta o sucesso das espécies de *Neisseria* no hospedeiro humano <sup>(9,13)</sup>.

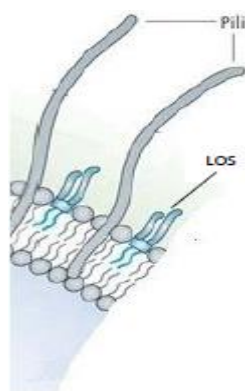


Figura 1 - Componentes proeminentes da membrana externa de *N. gonorrhoeae* (adaptado de <sup>(64)</sup>)

#### 1.2.1.1.2 Lipoligossacarídeo (LOS)

O peptidoglicano da membrana externa de *N. gonorrhoeae* possui LOS, que tem agarrado ao core da molécula uma curta cadeia polimérica de carboidratos, assim, ao contrário do lipopolissacarídeo (LPS) das outras bactérias de Gram negativo, o LOS é consideravelmente mais pequeno. O LOS é uma das estruturas chave na interface entre o hospedeiro e *N. gonorrhoeae*, protege a superfície da bactéria dos mecanismos imunes efetivos inatos e adaptativos do hospedeiro. Existe uma grande variação de LOS entre estirpes e na mesma estirpe de *N. gonorrhoeae*. Uma única estirpe pode ter até seis variantes de LOS. Uma vez que os açúcares envolvidos no core do LOS formam antígenos importantes para as reações bactericidas, a variação fenotípica destes antígenos pode ser patogenicamente importante. *N. gonorrhoeae* com LOS curto é sensível à resposta imunológica do hospedeiro e tem a capacidade de invadir as células eucarióticas, enquanto *N. gonorrhoeae* com LOS comprido não é sensível à resposta imunológica mas não é invasiva. Certos locais do LOS imitam a estrutura de certos glicoesfingolipídios humanos ajudando à evasão do sistema imune do hospedeiro <sup>(61)</sup>. A habilidade da bactéria sializar o LOS (adição do ácido neuramínico ao LOS pela sialitransferase) varia, porque o local a sializar encontra-se num açúcar terminal que é variavelmente expresso. Os gonococos sializados estão parcialmente protegidos contra os anticorpos anti-LOS e anti-Por<sup>(9)</sup>. A toxicidade nas infeções por *N. gonorrhoeae* é devida, em grande parte, aos efeitos endotóxicos do peptidoglicano e do LOS, ambos estimulam a resposta inflamatória e a libertação do fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), responsável pela maioria dos sintomas associados à doença <sup>(13)</sup>.

#### 1.2.1.1.3 Porinas (Por) - Proteína I

A porina (Por) ou proteína I é a principal proteína da membrana externa da *N. gonorrhoeae*, sendo essencial para a sobrevivência e viabilidade da bactéria. É termoestável com 34 a 35 kDa, codificada pelo gene *porB* que possui dois alelos, o *porA1a* e *porB1b*. Ocupa toda a

espessura da membrana e tem como função controlar a entrada e saída de moléculas para o espaço periplasmático.

Uma dada estirpe produz uma ou outra, mas nunca as duas proteínas PorA (P1A) ou PorB (P1B)<sup>(9)</sup>. A porina P1B de *N. gonorrhoeae* tem a propriedade de modular a apoptose da célula eucariótica através da interação com os canais dependentes de voltagem aniônica nas mitocôndrias. As porinas também auxiliam na invasão celular e cooperam com os pili para modular a sinalização celular através da indução sequencial do fluxo de cálcio e na mobilização do cálcio intracelular para as células alvo. Estas proteínas têm sido utilizadas em pesquisas epidemiológicas para caracterização fenotípica dos gonococos<sup>(13)</sup>.

#### 1.2.1.1.4 Proteínas de Opacidade (Opa) - Proteína I I

As proteínas Opa de *Neisseria sp* transmitem maior opacidade às colônias que as expressam. As proteínas Opa (adesinas) são da família de moléculas transmembranares e formam oito cadeias de estruturas em folha  $\beta$  na membrana externa da bactéria com quatro loops expostos à superfície<sup>(13)</sup>. Estas proteínas facilitam a aderência entre as bactérias e as células eucariotas (neutrófilos e células epiteliais) e atuam na evasão ao sistema imune por variação antigénica, coadjuvando á invasão do hospedeiro<sup>(9)</sup>. Uma única estirpe pode expressar de nenhuma a quatro ou cinco proteínas Opa simultaneamente e a alternância da fase “on/off” dos distintos genes opa aumentam a variação antigénica. As proteínas Opa sofrem variação de fase (Opa+ e Opa-) e variação antigénica (opaA, opaB, opaC...), de uma forma análoga às variações pili. Cada gene *opa* é um gene completo com zona promotora, e é sempre transcrito em ácido ribonucleico (RNA). A variação de expressão destes genes é conseguida variando a unidade pentamérica de repetição localizada imediatamente a seguir ao codão de iniciação ATG. Quando o número das repetições é divisível por 3 (ex. 9, 12, 15) o gene, ainda assim, apresenta-se no quadro de leitura, e é expressa uma proteína Opa (Opa+). Qualquer outro número de repetições da unidade pentamérica resulta na transcrição do gene que está fora do quadro de leitura de tradução e nenhuma proteína Opa é expressa (Opa-). Cada gene *opa* contém dois domínios hipervariáveis, que podem recombinar-se com domínios semelhantes em outros loci opa. Assim, a expressão variável dos genes *opa* resulta em variação antigénica, devido às diferenças nas estruturas codificadas por diferentes genes opa<sup>(9)</sup>.

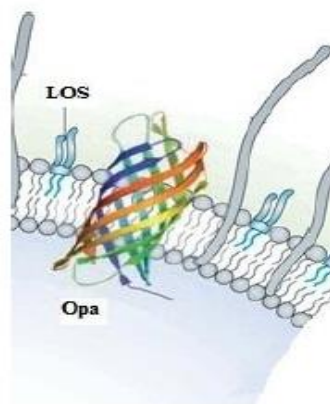


Figura 2 - Proteína Opa na membrana externa de *N. gonorrhoeae* (adaptado de<sup>(64)</sup>)

#### 1.2.1.1.5 Proteína Rpm – Proteína III

É uma proteína que faz parte da membrana externa da *N. gonorrhoeae* também conhecida como proteína de redução modificável (reduction modifiable protein - Rmp) e tem um peso molecular de 30 a 31 kDa. Tem relação estreita com o LOS e a Por, poucas variações intra e inter estirpes, e demonstra acentuada semelhança antigénica com a proteína da membrana externa da *E. coli*, a OmpA. Devido a estas semelhanças, os anticorpos contra a OmpA unem-se à proteína III, na superfície dos gonococos, bloqueando a ligação dos anticorpos anti-LOS e anti-Por, diminuindo o efeito bactericida do soro humano sobre os mesmos <sup>(9)</sup>.

#### 1.2.1.1.6 Proteína Fbp

Algumas das proteínas de ligação ao ferro são recetores de ligandos de ferro, como a transferrina, lactoferrina e hemoglobina. A *N. gonorrhoeae* possui recetores funcionais de transferrina e hemoglobina, mas nem todos possuem recetores funcionais de lactoferrina. Em estudos com voluntários humanos estabeleceu-se que os recetores da lactoferrina e da transferrina são essenciais para a infeção experimental da uretra anterior; a presença de ambos os recetores confere uma vantagem seletiva na uretra masculina. Desta forma, os recetores de lactoferrina e transferrina parecem ser funcionalmente importantes para a infeção da mucosa. A expressão do recetor de hemoglobina é sujeito a variação de fase e foi demonstrado que os isolados de mulheres nas primeiras duas semanas do ciclo menstrual têm maior expressão destes recetores quando comparados com os isolados de mulheres na outra metade do ciclo ou isolados de homens, sugerindo que a disponibilidade de hemoglobina seja uma vantagem seletiva para a bactéria *in vivo* <sup>(9)</sup>.

#### 1.2.1.1.7 Proteína H8

Conhece-se pouco, acerca desta proteína, mas existem pelo menos duas proteínas com epítopo de ligação reconhecido por anticorpos monoclonais H8, em *N. gonorrhoeae*. Uma delas é a lipoproteína azurina (Laz) que está envolvida na defesa contra o *stress* oxidativo e toxicidade do cobre <sup>(9)</sup>.

### 1.3 Manifestações clínicas associadas à infeção gonocócica

Depois do contato sexual com um parceiro infetado e vencidas as barreiras naturais da mucosa, a infeção evolui para a doença. Em alguns casos é um processo localizado, sem maiores repercussões, enquanto em outros ocorrem complicações no próprio aparelho urogenital ou à distância, provocando alterações sistémicas <sup>(14)</sup>.

A infeção gonocócica na mulher em mais de 50% não é acompanhada de sintomas sendo a cervicite, a infeção não complicada mais frequente. Os sinais mais frequentes da cervicite



incluem corrimento vaginal, disúria e metrorragias. Cervicites prolongadas e sem tratamento adequado podem causar infecções ascendentes (endometrite, salpingite, abscesso nas trompas de Falópio e ovários) que em determinados casos podem levar à complicação mais comum na mulher conhecida como doença inflamatória pélvica (DIP), que por sua vez pode causar infertilidade, gravidez ectópica e aborto precoce <sup>(14)</sup>.

A maior parte dos homens com gonorreia apresenta sintomas. A uretrite é a principal manifestação clínica na forma não complicada da doença manifestando-se geralmente com corrimento uretral abundante e disúria. As complicações mais comuns são a epididimite, prostatite, orquite, abscesso periuretral e linfadenopatias inguinais. A orquitepididimite poderá provocar a diminuição da fertilidade, levando até a esterilidade <sup>(14,16)</sup>.

O período de incubação da doença nos homens é de 2 a 5 dias, sendo na mulher mais variável e menos definido que nos homens. Contudo, a grande maioria das mulheres torna-se sintomática no intervalo de tempo de 10 dias <sup>(8,14)</sup>. Em ambos os sexos a infecção pode disseminar-se pelo organismo causando infecção gonocócica disseminada (IGD), uma complicação grave que ocorre em 1 a 2% dos pacientes infetados, e está relacionada com casos assintomáticos não tratados ou com infecção por gonococos multirresistentes. Várias manifestações clínicas estão associadas à IGD nomeadamente mialgia, artralgia, poliartrite. Ocasionalmente provoca complicações, como endocardite, septicemia e meningite <sup>(15)</sup>.

A gonorreia na gravidez está associada ao risco aumentado de aborto espontâneo, parto prematuro, rutura prematura de membranas e mortalidade fetal perinatal.

A transmissão vertical de *N. gonorrhoeae* acontece entre 30 a 40% dos casos de mães infetadas e, a doença manifesta-se no recém-nascido 3 a 5 dias após o nascimento com manifestações de conjuntivite purulenta aguda (*oftalmia neonatorum*) que na ausência de tratamento pode originar cegueira. Em adultos também pode ocorrer infecção da mucosa conjuntiva por inoculação involuntária através das mãos. Os sintomas mais frequentes são fotofobia, celulite periorbital, exsudado purulento profuso, edema, eritema das pálpebras e queratite epitelial.

A faringite gonocócica é na maioria dos casos assintomática mas noutros pode causar dor, eritema, corrimento faríngeo e úlceras pseudomembranosas.

A infecção da mucosa retal, apesar de grande parte das vezes não ser acompanhada por sintomatologia, pode levar a proctite gonocócica, inflamação do reto, que se manifesta com dor, secreção rectal purulenta e hemorragias <sup>(17)</sup>.

A tabela 1 resume as manifestações clínicas da infecção gonocócica no homem e na mulher tendo em conta a localização da infecção. Estão igualmente sintetizadas as complicações associadas tanto à infecção gonocócica genital como à infecção gonocócica disseminada.

Tabela 1 - Manifestações clínicas da infeção gonocócica

Localizações/ Complicações	Homem	Mulher
Trato genital	Uretrite: Secreção uretral purulenta Disúria	Cervicite: Disúria Corrimento vaginal Metrorragias
Complicações da infeção gonocócica genital	Epididimite Prostatite Orquite Abscessos periuretrais Linfadenopatias inguinais	Endometrite Salpingite Abscessos nas trompas de Falópio e ovários DIP
Reto	Secreção retal purulenta Hemorragia retal Dor ao defecar	Secreção retal purulenta Hemorragia retal Dor ao defecar
Faringe	Eritema Dor e corrimento faríngeo Linfadenopatia cervical Úlcera pseudomembranosa	Eritema Dor e corrimento faríngeo Linfadenopatia cervical Úlcera pseudomembranosa
Ocular (Transmissão perinatal ou autoinoculação)	Conjuntivite purulenta Fotofobia Celulite periorbital Edema Eritema das pálpebras Úlcera da córnea	Conjuntivite purulenta Fotofobia Celulite periorbital Edema Eritema das pálpebras Úlcera da córnea
IGD	Mialgia Artralgia Poliartrite Dermatite	Mialgia Artralgia Poliartrite Dermatite
Complicações da IGD	Septicémia Endocardite Meningite	Septicémia Endocardite Meningite

DIP: Doença Inflamatória Pélvica

IGD: Infeção Gonocócica Disseminada

#### 1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da gonorreia estabelece-se pela identificação da *N. gonorrhoeae* nas secreções genitais, rectais, faríngeas ou oculares.

A bactéria pode ser detetada por testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), cultura e, em algumas situações por microscopia num esfregaço corado do trato genital. Nenhum teste oferece 100% de sensibilidade e especificidade <sup>(18)</sup>.

A Microscopia (× 1000) com coloração de Gram ou Azul de Metileno permite a identificação de diplococos em leucócitos polimorfonucleares e oferece boa sensibilidade (≥95%) e especificidade (98%) como teste diagnóstico rápido em homens sintomáticos com corrimento uretral. A sensibilidade baixa consideravelmente em homens assintomáticos (≤55%), na identificação de infeção endocervical (≤55%) ou rectal (≤ 40%). Para a identificação da infeção faríngea, a microscopia não é de todo recomendada devido à baixa especificidade e sensibilidade <sup>(19)</sup>.

A cultura é um teste de diagnóstico específico, barato e permite a realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, o que se traduz numa grande vantagem relativamente

aos restantes testes, tendo em conta o elevado número de estirpes resistentes de *N. gonorrhoeae*. A cultura, até à data, representa o *Gold standard* para o diagnóstico laboratorial. Os meios de cultura seletivos (contendo antibióticos, antifúngicos e vitaminas) são preferencialmente recomendados relativamente aos não seletivos, em especial quando se pretende o isolamento dos gonococos de locais onde existe uma elevada quantidade de microrganismos saprófitas (faringe, reto e zona endocervical). A cultura é apropriada para amostras genitais, rectais, faríngeas e conjuntivais, mas não para amostras de urina. A sensibilidade da cultura é elevada para amostras genitais desde que os procedimentos de colheita, transporte, armazenamento e isolamento de amostras sejam devidamente cumpridos.

As colónias típicas (pequenas, translúcidas, acinzentadas, convexas, brilhantes e de bordos lisos) surgem em 24 a 48 horas, porém a sua viabilidade no meio perde-se rapidamente por autólise.

Os NAATs têm uma sensibilidade mais elevada (>90%) que a cultura e permitem obter resultados mais rapidamente. Estes testes têm a possibilidade de serem utilizados numa grande variedade de amostras sendo simultaneamente menos exigentes relativamente à qualidade, transporte e armazenamento das mesmas <sup>(18)</sup>. A sensibilidade é elevada tanto em infeções sintomáticas como assintomáticas e revela-se igualmente elevada em amostras de urina embora seja superior no caso dos homens.

Outra vantagem relativamente aos NAATs é a possibilidade de diagnosticar coinfeções do trato genital causadas por *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* ou outras ISTs.

Apesar dos NAATs serem significativamente mais sensíveis do que a cultura para detetar a infeção faríngea e retal, ainda assim a sensibilidade não é alta e depende do NAAT utilizado. A menor especificidade (98,1-99,7%) de alguns NAATs, particularmente os de 1ª geração, leva a um menor valor preditivo positivo (VPP) especialmente em populações em que existe uma baixa prevalência de infeções por *N. gonorrhoeae* ou em locais onde possa existir reação cruzada com outras espécies de Neisseria.

Existe falta de recomendações sobre o período mínimo de incubação necessário para a realização do teste mas a experiência clínica sugere que os resultados positivos de NAAT podem ser observados 1 a 2 dias após a infeção <sup>(18,19)</sup>.

Segundo as recomendações europeias, os seguintes critérios são indicação para realização da pesquisa de *N. gonorrhoeae* <sup>(19)</sup>:

- Sintomas ou sinais de corrimento uretral em homens;
- Corrimento vaginal com fator de risco para IST (idade <30 anos, novo parceiro sexual);
- Cervicite mucopurulenta;
- Pessoas diagnosticadas com outras ISTs;
- Parceiro sexual de pessoas com IST ou DIP;
- Epidídimo-orquite aguda em homens com idade <40 anos;
- Doença inflamatória pélvica aguda;
- Rastreio de jovens adultos (<25 anos de idade) para infeções sexualmente transmissíveis;
- Rastreio de indivíduos com novos ou múltiplos parceiros sexuais;
- Conjuntivite purulenta em recém-nascido ou adulto;
- Mãe de um recém-nascido com *oftalmia neonatorum* <sup>(19)</sup>.

### 1.4.1 Sequenciação de Nova Geração

A sequenciação de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) tornou-se, nos últimos anos, a tecnologia de eleição para análises genéticas complexas que antes eram tecnicamente impossíveis e/ou extremamente dispendiosas. Estas tecnologias, em rápida evolução, demonstraram vantagens sobre a sequenciação por Sanger, sendo a mais relevante a capacidade de gerar grandes quantidades de dados (de mega para gigabases), devido à sua enorme capacidade de sequenciação em paralelo, tudo isto com grande economia de tempo e custos <sup>(20)</sup>. A tecnologia NGS tem sofrido, durante a última década, um desenvolvimento exponencial associado a um decréscimo considerável de custos, facilidade de procedimentos/manipulação, rapidez e capacidade de geração de sequências (reads). Para isto, tem igualmente contribuído o incessante aparecimento de ferramentas para análise bioinformática, as quais têm permitido, não só maior capacidade e rapidez de análise dos dados gerados, mas também análises mais detalhadas e robustas.

Na área da Microbiologia, os avanços na tecnologia de NGS, nomeadamente a vertente de Sequenciação Total do Genoma (*Whole Genome Sequencing* - WGS) têm-se destacado como uma excelente ferramenta para complementar e/ou substituir as tradicionais metodologias laboratoriais, influenciando de forma inequívoca o diagnóstico, a monitorização epidemiológica e a análise genética detalhada de vírus, bactérias, fungos e parasitas. Permite sequenciar o genoma completo de microrganismos entre 12h e 2 dias, não só a partir de culturas, como também, em determinadas condições, diretamente de amostras. Entre as principais aplicações da WGS nos laboratórios de microbiologia Clínica destacam-se: o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico através da identificação por WGS de sequências genómicas específicas de microrganismos, caracterização genómica detalhada do microrganismo infeccioso através de identificação de fatores de virulência, toxinas, e genes ou mutações associados à resistência a fármacos e a tipagem molecular de estirpes isoladas no âmbito de surtos hospitalares ou na comunidade, permitindo a identificação de cadeias de transmissão e de fontes de contaminação <sup>(20,21)</sup>.

## 1.5 Epidemiologia

A prevalência de ISTs tem aumentado a nível mundial e representam atualmente um importante problema de Saúde Pública. Têm uma elevada incidência, elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos, afetam a qualidade de vida e causam grave morbilidade e mortalidade.

As ISTs podem causar complicações graves e sequelas a longo prazo, incluindo doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, infertilidade, dor pélvica crónica e doenças neurológicas e cardiovasculares em adultos, morte neonatal, parto prematuro, malformações no feto, cegueira ou incapacidade grave em lactentes.

As ISTs têm também um papel importante no aumento do risco de aquisição e transmissão do HIV, tendo assim um significativo impacto socioeconómico.

A nível mundial mais de um milhão de ISTs curáveis são adquiridas diariamente. Em 2012, a OMS estimou em 357 milhões o número de novos casos de IST curáveis entre adolescentes e adultos com idades entre os 15 e 49 anos: 131 milhões de casos de Clamídia, 78 milhões de casos de gonorreia, 6 milhões de casos de sífilis e 142 milhões de casos de tricomoníase <sup>(18)</sup>.

A gonorreia afeta tanto países em desenvolvimento como países desenvolvidos e a nível mundial os 78 milhões de novos casos de *N. gonorrhoeae* distribuem-se da seguinte forma: 35,2 milhões na região do Pacífico ocidental, 11, 4 milhões na região Sudeste Asiático, 11,4 milhões na região Africana, 11,0 milhões na região Americana, 4,7 milhões na região Europeia e 4,5 milhões na região do Mediterrâneo oriental <sup>(42)</sup>. Estas infeções ocorrem entre adolescentes e adultos com uma taxa de incidência global de 19 em 1000 mulheres e 24 em 1000 homens <sup>(18)</sup>.

O *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) determinou a *N. gonorrhoeae* como sendo a segunda causa bacteriana mais notificada de IST na Europa, a seguir à infeção por *Chlamydia trachomatis*.

Em 2014, segundo os últimos dados disponibilizados pelo ECDC, foram notificados 66.413 casos de gonorreia em 27 países da União Europeia e da área económica europeia (EU/EEA), com uma taxa de incidência de 20 casos por 100.000 habitantes.

Entre 2008 e 2014, a taxa global de infeções gonocócicas relatadas em toda a Europa mais do que duplicou, passou de 8 por 100 000 para 20 casos para 100 000 pessoas e o número de casos reportados continua a aumentar, sendo o aumento em 2015 25% superior em relação a 2013.

As taxas de infeção por *N. gonorrhoeae* variam consideravelmente em toda a Europa, conforme representado na figura 3, sendo mais elevadas a norte do continente, Reino Unido (60 por 100 000), Irlanda (28 por 100 000), Dinamarca (20 por 100 000) e Letónia (18 por 100 000).

A taxa de incidência relativamente ao género é de 10 por 100 000 mulheres e 35 por 100 000 homens (ratio homem-mulher é de 2,7:1). Os homens que praticam sexo com homens (HSH) representam 44% dos casos de gonorreia relatados na UE / EEA, sendo uma percentagem apenas um pouco menor do que a contribuída pelos homens e mulheres heterossexuais em conjunto, 49%. Embora sejam relatados aumentos das infeções gonocócicas em todos os grupos, este aumento é particularmente superior nos HSH <sup>(43)</sup>.

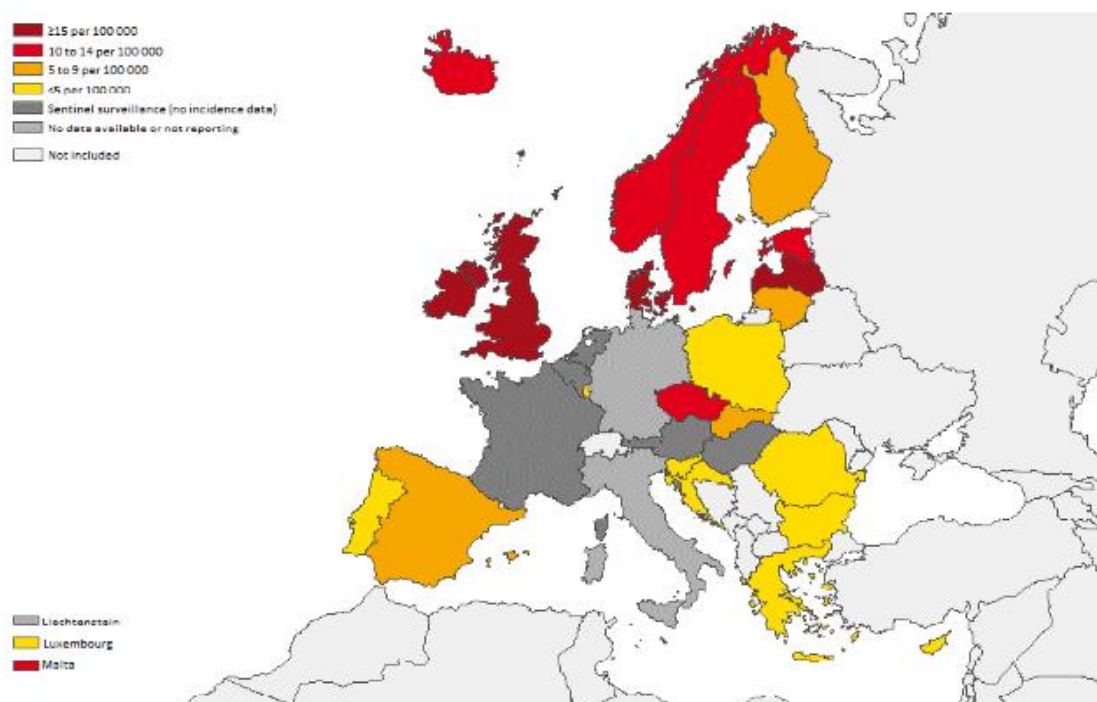


Figura 3 - Taxa de casos de gonorreia confirmada por 100 000 habitantes, EU/EEA, 2014

Fonte: *European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2016. Stockholm: ECDC, 2014*<sup>(43)</sup>.

O maior número de casos reportados de gonorreia em 2014 foi no grupo etário dos 20-24 anos de idade (107 por 100 000 habitantes). Relativamente ao género, as mulheres apresentaram maior número de infeções entre os 15-19 anos e os homens entre os 20-24 anos, sendo relativamente consistente o maior número de infeções em todos os grupos etários acima dos 20 anos no género masculino (figura 4)<sup>(43)</sup>.

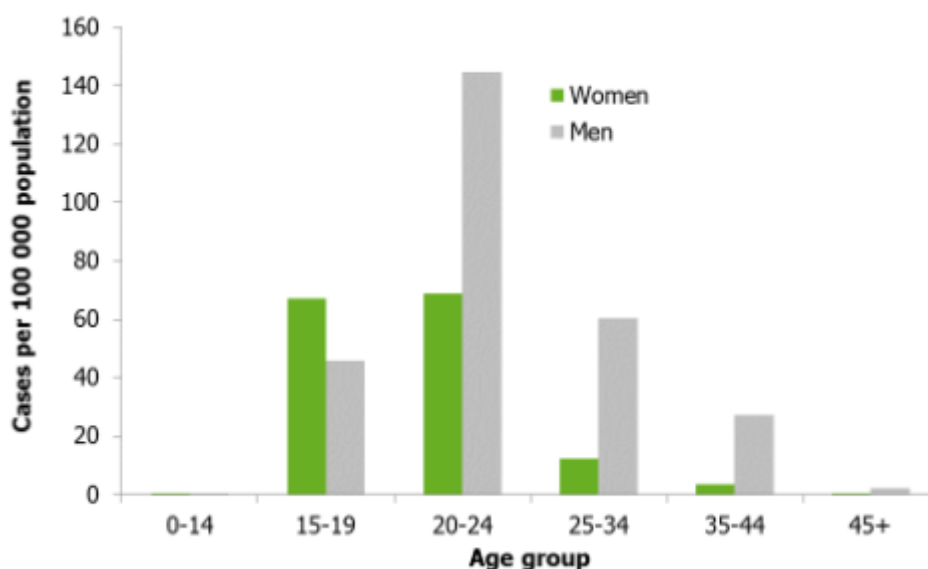


Figura 4 - Taxa de casos de gonorreia confirmada por 100 000 habitantes, por género e idade, EU/EEA, 2014

Fonte: *European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2016. Stockholm: ECDC, 2014*<sup>(43)</sup>.

No final da década de 70 observou-se, na grande maioria dos países da Europa Ocidental, um decréscimo da incidência de gonorreia. Em meados dos anos 90, porém, verificou-se um importante recrudescimento da doença nalguns países e, mais recentemente, um aumento da incidência nalgumas populações específicas de maior risco para aquisição de ISTs (HSH, toxicodependentes, trabalhadores do sexo e seus clientes)<sup>(49)</sup>.

O controlo da gonorreia em muitas populações tem sido difícil e permanece um exemplo primário da influência que os fatores demográficos, sociais e comportamentais exercem na epidemiologia de uma doença infecciosa. A gonorreia e outras ISTs são geralmente transmitidas por pessoas com infeções assintomáticas ou que têm sintomas ignorados ou não percebidos. Estima-se que 50 % das mulheres e 10 % dos homens infetados com *N. gonorrhoeae* sejam assintomáticos o que contribui para a disseminação da doença<sup>(45)</sup>.

## Neisseria gonorrhoeae e HIV

A gonorreia é um problema de saúde pública *per si* mas aumenta significativamente quando está associada a outras ISTs (HIV, vírus Herpes Simplex, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* e sífilis). Estas coinfeções são comuns e podem resultar em efeitos sinérgicos na transmissão e gravidade da doença <sup>(46)</sup>.

A coinfeção gonorreia e HIV é frequente e existe uma estreita relação bidirecional entre ambas. A infeção por *N. gonorrhoeae* aumenta o risco de aquisição e transmissão do HIV. Facto que se justifica devido ao aumento induzido pelos gonococos na expressão local do ARN viral em conjunto com a resposta inflamatória aguda gerada com a doença gonocócica (aumento de células vulneráveis ao HIV como linfócitos CD4) e a subsequente perda de integridade da mucosa vaginal e uretral.

Indivíduos que apresentem simultaneamente HIV e gonorreia têm maior risco de transmitir HIV, assim como os indivíduos que têm gonorreia apresentam maior vulnerabilidade em adquirir HIV.

Atualmente a coinfeção gonorreia-HIV é mais comum entre HSH <sup>(47)</sup>

### 1.5.1 Dados epidemiológicos em Portugal

Entre 2010 e 2014 Portugal tinha uma das taxas mais baixas a nível europeu (1.9/ 100.000 habitantes), conforme representado na tabela 2. Estas taxas baixas justificam-se, até 2014, provavelmente devido às características intrínsecas da notificação passiva dos sistemas de vigilância que conduziram à subnotificação de casos de gonorreia <sup>(44)</sup>.

Tabela 2 - Número e taxa de casos confirmados reportados por 100 000 habitantes, EU/EEA, 2010-2014

Country	2010		2011		2012		2013		2014	
	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate
Austria	331	-	470	-	402	-	1148	-	-	-
Belgium	752	-	842	-	931	-	1011	-	1119	-
Bulgaria	184	2.5	197	2.7	99	1.4	96	1.3	170	2.3
Croatia	-	-	-	-	14	0.3	14	0.3	22	0.5
Cyprus	23	2.8	11	1.3	6	0.7	2	0.2	4	0.5
Czech Republic	749	7.2	714	6.8	1142	10.9	1407	13.4	1385	13.2
Denmark	482	8.7	501	9	673	12.1	817	14.6	1141	20.3
Estonia	118	8.9	173	13	215	16.2	133	10.1	134	10.2
Finland	255	4.8	289	5.4	312	5.8	267	4.9	286	5.2
France	534	-	737	-	936	-	1349	-	1330	-
Germany	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Greece	312	2.8	378	3.4	238	2.1	219	2	245	2.2
Hungary	1170	-	1369	-	1487	-	1526	-	1620	-
Iceland	18	5.7	32	10	29	9.1	19	5.9	38	11.7
Ireland	625	13.7	834	18.2	1139	24.9	1273	27.7	1304	28.3
Italy	365	0.6	356	0.6	289	0.5	-	-	-	-
Latvia	349	16.5	545	26.3	607	29.7	554	27.4	365	18.2
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lithuania	315	10	248	8.1	219	7.3	190	6.4	165	5.6
Luxembourg	3	0.6	2	0.4	5	1	4	0.7	5	0.9
Malta	48	11.6	46	11.1	29	6.9	62	14.7	51	12
Netherlands	2815	-	3576	-	3996	-	4171	-	10729	-
Norway	412	8.5	368	7.5	443	8.9	506	10	682	13.4
Poland	301	0.8	298	0.8	733	1.9	549	1.4	495	1.3
Portugal	89	0.8	120	1.1	120	1.1	121	1.2	201	1.9
Romania	479	2.4	510	2.5	323	1.6	340	1.7	178	0.9
Slovakia	130	2.4	212	3.9	286	5.3	378	7	423	7.8
Slovenia	44	2.1	25	1.2	45	2.2	62	3	61	3
Spain	2306	5	2640	5.7	3044	6.5	3315	7.1	4562	9.8
Sweden	847	9.1	952	10.1	1090	11.5	1110	11.6	1337	13.9
United Kingdom	18710	29.9	23372	37.1	28779	45.3	32493	50.8	38361	59.7
EU/EEA total	32766	8.7	39817	10.5	47631	12.6	53136	17	66413	20

Fonte: *European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2016. Stockholm: ECDC, 2014* <sup>(43)</sup>.

Embora os dados relativos à gonorreia em Portugal, até à presente data, sejam relativamente escassos, o gráfico disponibilizado pela Direção Geral de Saúde (DGS), em 2015, revela os casos de infeções gonocócicas notificadas entre 1950-2014. Neste período representado na figura 5, podemos observar que o ano em que foram notificados maior número de casos de infeção gonocócica foi em 1971 (1463 casos) e o ano com menor número de casos notificados foi em 2004 (28 casos).



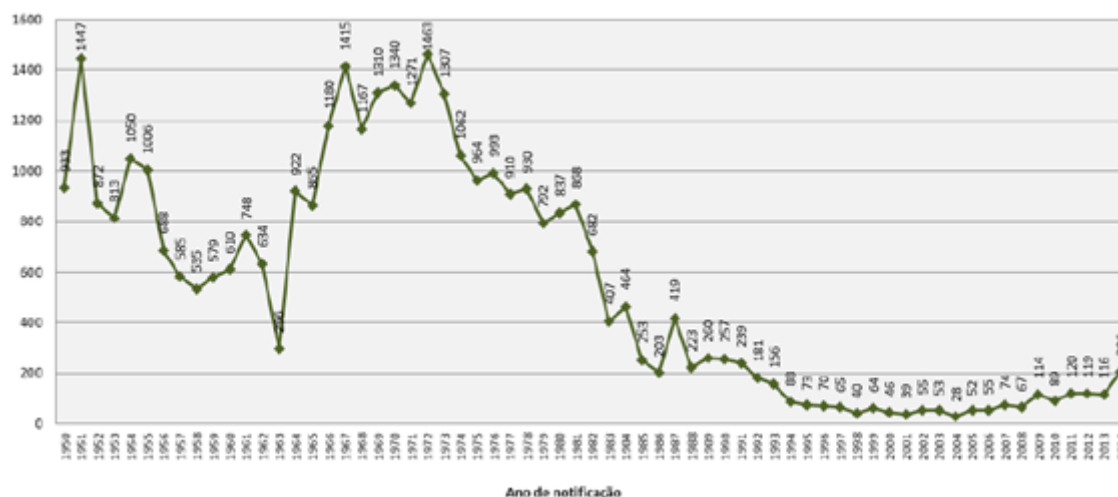


Figura 5 - Número de casos notificados de Infecções Gonocócicas, Portugal, 1950-2014

Fonte: Ministério da Saúde. Direção - Geral de Saúde (2015) Doenças de Declaração Obrigatória, 2011-2014 <sup>(48)</sup>

A tabela 3 ilustra a distribuição de casos de infecção gonocócica em Portugal por grupo etário. Após análise da mesma pode observar-se que o maior número de infeções ocorreu no grupo etário dos 25 aos 34 anos com exceção do ano de 2013, em que se verificou um maior número de infeções entre os 15 e os 24 anos, em ambos os sexos.

Tabela 3 - Número de casos notificados de Infecções Gonocócicas, por grupo etário, sexo e ano de notificação, Portugal, 2011-2014

Ano e sexo Grupo etário	2011			2012			2013			2014			Total
	M	F	MF	M	F	MF	M	F	MF	M	F	MF	
<1 ano	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	2	3
1-4 anos	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	2
5-14 anos	0	1	1	1	3	4	0	1	1	1	0	1	7
15-24 anos	32	10	42	33	8	41	32	15	47	61	8	69	199
25-34 anos	47	2	49	49	0	49	31	8	39	66	11	77	214
35-44 anos	18	1	19	16	1	17	12	0	12	38	2	40	88
45-54 anos	5	1	6	4	0	4	10	1	11	11	0	11	32
55-64 anos	2	0	2	2	1	3	2	1	3	6	0	6	14
65-74 anos	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
75 ou+ anos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>105</b>	<b>15</b>	<b>120</b>	<b>105</b>	<b>14</b>	<b>119</b>	<b>89</b>	<b>27</b>	<b>116</b>	<b>185</b>	<b>21</b>	<b>206</b>	<b>561</b>

Fonte: Ministério da Saúde. Direção - Geral de Saúde (2015) Doenças de Declaração Obrigatória, 2011-2014 <sup>(48)</sup>.

Um conhecimento fundamentado da incidência de infecção gonocócica em Portugal até 2014 é muito difícil. Por um lado, se o recurso limitado a meios laboratoriais diferenciados não permite na maioria dos casos o diagnóstico etiológico, por outro, mesmo quando o diagnóstico era feito, o número de casos que eram notificados era muito inferior ao número real <sup>(49)</sup>.



Com o desenvolvimento dos padrões de vigilância epidemiológica, tanto a nível nacional como internacional, houve necessidade de efetuar uma revisão e atualização dos mesmos em Portugal. Por conseguinte, é publicado um despacho em 2014 que determina a gonorreia como doença de notificação obrigatória e define os critérios clínicos, laboratoriais e epidemiológicos para a mesma. Determina ainda que só o diagnóstico laboratorial permite definir caso confirmado.

#### Critérios clínicos

Pessoa que preenche pelo menos um dos oito critérios seguintes:

- a) Uretrite;
- b) Salpingite aguda;
- c) Doença inflamatória pélvica;
- d) Cervicite;
- e) Epididimite;
- f) Proctite;
- g) Faringite;
- h) Artrite.

Ou

Qualquer recém-nascido com conjuntivite.

#### Critérios laboratoriais:

Pelo menos um dos quatro critérios:

- Isolamento da *N. gonorrhoeae* a partir de uma amostra biológica;
- Detecção de ácido nucleico de *N. gonorrhoeae* numa amostra biológica;
- Demonstração da presença de *N. gonorrhoeae* numa amostra, por teste que utilize sondas para a deteção de ácido nucleico (probest) não amplificados;
- Detecção microscópica de diplococos de Gram negativo intracelulares numa amostra uretral masculina;

#### Critérios epidemiológicos

Pelo menos uma das ligações epidemiológicas seguintes:

- a) Contacto sexual com um caso confirmado
- b) Contágio por via vertical, sendo a mãe um caso confirmado.

Caso provável: Pessoa que preenche os critérios clínicos e epidemiológicos.

Caso confirmado: Pessoa que preenche os critérios laboratoriais <sup>(50)</sup>.

### 1.6 Resistência Antimicrobiana em *Neisseria gonorrhoeae*

Vários fatores tanto “microbianos” como “não microbianos” têm contribuído para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (AMR) em *N. gonorrhoeae*. O acesso irrestrito a antibióticos, a escolha errada do tipo e dosagem dos mesmos, a utilização de fármacos de qualidade duvidosa, a não-adesão ao tratamento por parte do doente e/ou dos seus parceiros sexuais, ou estadias em países nos quais a resistência a determinados fármacos é endémica são alguns dos fatores não microbianos. Os mecanismos inerentes ao próprio microrganismo são a mutação genética do cromossoma, cujo aparecimento e disseminação são normalmente mais lentos e/ou a aquisição genética parcial ou total de elementos extra cromossómicos (plasmídeos), mais frequente e de disseminação mais rápida. Tais fenómenos induzem resistência ao dificultar o acesso do antibiótico à proteína-alvo ou por causarem uma diminuição ou mesmo perda de afinidade com a proteína-alvo <sup>(22,23)</sup>.

O acesso do antibiótico à proteína-alvo pode ser limitado por uma redução da permeabilidade da parede celular causada por alterações nas proteínas “porina”, exportação ativa de antibióticos a partir da célula por meio de bombas de efluxo e destruição do antibiótico antes de conseguir interagir com o alvo.

A diminuição ou mesmo perda de afinidade com a proteína-alvo resulta numa redução da sua afinidade para o antibiótico.

Assim sendo, podem coexistir, num único microrganismo, diferentes determinantes de resistência de modo a que o nível de resistência possa aumentar de forma incremental e uma única estirpe possa ser resistente a vários antibióticos <sup>(22)</sup>.

### 1.6.1 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

#### Resistência à penicilina

Os alvos dos agentes  $\beta$ -lactâmicos são as proteínas de ligação à penicilina (PBP), enzimas localizadas na parede celular que participam no seu metabolismo. Alterações nas proteínas PBP-2 e PBP-1 reduzem a sua afinidade para a penicilina, e assim a suscetibilidade do microrganismo. A PBP-2 é codificada pelo locus *penA*. O gene *mtr* medeia a sensibilidade a uma ampla gama de antibióticos por meio de um sistema ativo de efluxo. As mutações no locus *penB* resultam na redução da permeabilidade da parede celular aos antibióticos hidrofílicos e outros compostos. O efeito combinado das mutações *penA* e expressão aumentada de *mtr* resulta num aumento da concentração mínima inibitória (CMI) da penicilina. As estirpes que apresentam estas alterações são denominadas *N. gonorrhoeae* cromossomicamente resistente (NGRC). Além da resistência mediada pelo cromossoma, a resistência à penicilina é também mediada por um plasmídeo induzível, TEM-1 tipo  $\beta$ -lactamase. A enzima  $\beta$ -lactamase é conhecida por hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas, inativando-o. Pelo menos seis plasmídeos que codificam  $\beta$ -lactamase foram descritos em *N. gonorrhoeae* <sup>(59)</sup>.

A produção de  $\beta$ -lactamases por *N. gonorrhoeae* produtora de penicilinas (*penicillinase producing Neisseria gonorrhoeae* - PPNG) e alterações cromossômicas por NGRC podem coexistir no mesmo isolado no entanto, a produção de  $\beta$ -lactamases por incorporação de material genético (plasmídeos) tem sido considerada o mecanismo de resistência mais importante no que se refere à penicilina <sup>(25)</sup>.

#### Resistência às tetraciclina

A resistência às tetraciclina de uma forma homóloga à resistência à penicilina deve-se, tanto a mutações no cromossoma como à aquisição de plasmídeos. As mutações nos loci *mtr*, *penB* e *tet* no cromossoma medeiam resistência de baixo nível a tetraciclina. Níveis bem mais altos de resistência são encontrados nas estirpes de *N. gonorrhoeae* que contêm o plasmídeo TC. O mecanismo de resistência mediado por este plasmídeo envolve a produção de uma proteína citoplasmática, que protege os ribossomas da ação das tetraciclina <sup>(59)</sup>.

#### Resistência às quinolonas

A resistência às quinolonas é mediada cromossomicamente e desenvolveu-se gradualmente ao longo de vários anos.

O acesso das quinolonas aos seus alvos é reduzida por alterações na permeabilidade da parede celular e, possivelmente, por mecanismos de efluxo. As quinolonas atuam por inibição da DNA girase (codificada pelo gene *gyrA*) e da DNA topoisomerase IV (codificada pelo gene *parC*), enzimas essenciais para o processo de transcrição e replicação do DNA bacteriano. As mutações nos genes *gyrA* e *parC* medeiam resistência de alto nível às quinolonas <sup>(60)</sup>.

## Resistência às cefalosporinas

Tal como as penicilinas, as cefalosporinas inibem a síntese da parede celular por inibição das enzimas de transpeptidação. A resistência às cefalosporinas ocorre também por mutação genética no cromossoma <sup>(59)</sup>.

### 1.6.2 Epidemiologia das resistências antimicrobianas em *N. gonorrhoeae*

Em termos epidemiológicos, a resistência antimicrobiana em *N. gonorrhoeae* pode ser dividida em três períodos: pré-quinolona, quinolona e pós-quinolona <sup>(22)</sup>.

A Era pré-quinolona:

Entre finais do século XIX e as três primeiras décadas do século XX, o protargol (composto à base de prata) era o único agente disponível para o tratamento da gonorreia. A introdução da antibioterapia convencional ocorreu em 1936, com a utilização das sulfonamidas. Os primeiros relatos de resistência surgiram dois anos depois, tendo atingido proporções mundiais em 1944/45 <sup>(22,23)</sup>.

As penicilinas foram introduzidas em 1943, tendo permanecido como tratamento de primeira linha durante 40 anos. Durante os primeiros 10-15 anos, o aumento progressivo da concentração mínima inibitória (CMI) e o consequente aumento das doses terapêuticas, constituiu o prenúncio da emergência de estirpes resistentes. Em 1958 surgiram os primeiros relatos de resistência por mutação genética e, em 1976 foram descritas as primeiras estirpes cuja resistência foi mediada por elementos genéticos móveis (plasmídeos) - PPNG <sup>(23,24)</sup>.

O primeiro caso de PPNG em Portugal foi relatado por Torgal Garcia et al.<sup>23</sup>, em 1982, tendo sido observado na valência de venereologia, mais conhecida como "Consulta das Francesinhas", do atual Centro de Saúde da Lapa <sup>(25)</sup>.

O aparecimento e a rápida disseminação mundial das PPNG ditaram, a partir de 1989, o abandono das penicilinas como fármacos de primeira linha e a sua contra-indicação na maior parte dos países <sup>(22)</sup>.

Ainda durante a era pré-quinolona, os aminoglicosídeos (canamicina, gentamicina), o cloranfenicol e o seu análogo tianfenicol, os macrólidos (eritromicina e, mais tarde, a azitromicina), a espectinomicina e as tetraciclinas constituíram importantes armas terapêuticas na infeção gonocócica. A resistência por mutação genética ocorreu para todas estas moléculas e, por incorporação de material extra-cromossomático (plasmídeo), apenas para as tetraciclinas. Estas últimas ficaram conhecidas por "*N. gonorrhoeae* resistentes à tetraciclina" [Tetracycline Resistant *N. gonorrhoeae* (TRNG)] <sup>(23,24)</sup>.

Era quinolona:

As fluoroquinolonas foram introduzidas em 1989 no tratamento da infeção gonocócica. Em 1993 três tipos (ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina) foram aprovados pelo CDC [Centro para Prevenção e Controlo de Doenças – Estados Unidos da América (EUA)] como fármacos de primeira linha. Percebeu-se que, entre as quinolonas, as fluoroquinolonas tinham excelente absorção oral e boa distribuição nos tecidos. As fluoroquinolonas alcançam excelentes níveis nos fluidos intersticiais e a penetração nos macrófagos é boa. Devido à sua excelente

segurança e tolerabilidade, estas tornaram-se alternativas populares à penicilina e derivados de cefalosporina, no tratamento de várias infecções, incluindo infecção gonocócica. As fluoroquinolonas foram brevemente consideradas o agente antimicrobiano "ideal", uma vez que estas possuíam um largo espectro de atividade antimicrobiana. Rapidamente, o que parecia a solução para um problema revelou-se uma desilusão. Em resposta ao aumento de isolados resistentes a ciprofloxacina em todo o mundo, muitos países a partir do ano 2000 descontinuaram a recomendação de fluoroquinolonas para o tratamento da gonorreia. Também na Europa se interrompeu a recomendação de ciprofloxacina em 2005 <sup>(22)</sup>.

### Era pós-quinolona

Com o desuso das fluoroquinolonas, as cefalosporinas de terceira geração tornaram-se os principais fármacos no tratamento da gonorreia. O início da sua utilização remonta, no entanto, aos primórdios da década de 1980 [ceftriaxona (1980) e cefixima (1983)]. Em 2006 foram recomendadas pelo CDC como antimicrobianos de primeira linha (associadas à azitromicina). Atualmente são ainda poucos os casos relatados de resistência a estes antimicrobianos. Contudo, a suscetibilidade à cefixima tem vindo a diminuir mais rapidamente e no Japão, as taxas de resistência atingiram mesmo os 30% em seis hospitais centrais. Subsequentemente, falhas de tratamento com cefixima em monoterapia foram também reportadas na Europa <sup>(26)</sup>.

Relativamente à ceftriaxona, embora o número de isolados resistentes seja menor quando comparada com a cefixima, existem casos reportados e são motivo de grande preocupação para a saúde pública, tendo em conta que a ceftriaxona é atualmente a última linha de tratamento para a gonorreia. Foram reportados casos isolados de resistência em alguns países, nomeadamente no Japão<sup>(27)</sup>, França<sup>(28)</sup>, Espanha<sup>(29)</sup>, Austrália<sup>(30)</sup>, Suécia<sup>(31)</sup> e Eslovénia<sup>(32)</sup>.

Das resistências à ceftriaxona acima mencionadas, cinco ocorreram em isolados provenientes da faringe e foram verificadas na Austrália (n = 2), Suécia (n = 1), Eslovénia (n = 1) e Japão (n = 1)<sup>(33)</sup>(tabela 4). Mais recentemente, em 2016, foi reportado o primeiro caso de falha de tratamento com terapêutica dupla (ceftriaxona + azitromicina) no Reino Unido e também este caso ocorreu num isolado proveniente da faringe <sup>(58)</sup>.

Tabela 4 - Falhas de tratamento com ceftriaxona verificadas globalmente (Adaptado de <sup>(33)</sup>)

País	Tratamento com ceftriaxona	Tratamento final sucesso	Local da infecção	Referência
Austrália (n=2)	250mg x 1	Ceftriaxona 500mg X 1 /ceftriaxona1g X 1	Faringe	30
Suécia (n=1)	250mg x 1 e 500mg x 1	Ceftriaxona 1g x 1	Faringe	31
Eslovénia (n=1)	250mg x 1	Ceftriaxona 250mg X 1 + azitromicina1g X 1	Faringe	32
Japão (n=1)	1g x 1	Nenhum	Faringe	27

Embora as infeções extra-genitais, e em particular as infeções faríngeas, sejam menos frequentes e as concentrações bacterianas sejam, regra geral, mais baixas que noutros locais, pensa-se que a faringe seja um local favorável para a emergência de AMR em *N. gonorrhoeae*. O tratamento eficaz das infeções da faringe, mesmo tendo em conta os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, é mais difícil do que o tratamento de infeções urogenitais. Enquanto a taxa média de cura para infeção urogenital é de 96%, as taxas caem para 79% e 84% (Homens e Mulheres) para infeções orofaríngeas <sup>(56,57)</sup>. Esta situação pode dever-se tanto à menor biodisponibilidade do antibiótico neste local, como à capacidade que a *N. gonorrhoeae* tem de interagir e trocar material genético com outras bactérias comensais existentes nesses locais anatómicos, e frequentemente sujeitas a carga antimicrobiana. As infeções faríngeas provavelmente funcionam como um reservatório de resistência antimicrobiana em *N. gonorrhoeae* e a persistência da bactéria nestes locais compromete os esforços globais para diminuir a disseminação da gonorreia resistente <sup>(56)</sup>.

O Programa de Vigilância Antimicrobiana Gonocócica da OMS (*Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme* - GASP) revelou que a AMR está a disseminar-se de uma forma global mas especialmente na Ásia, América do Norte, Europa, América Latina e Caribe e Austrália, com dados muito escassos relativamente a África e Ásia Central <sup>(40)</sup>.

Os últimos dados publicados, em 2015, pelo relatório epidemiológico de vigilância da suscetibilidade antimicrobiana gonocócica (Euro-GASP), em que participaram 24 países da UE/EEA, revelaram uma ligeira tendência de redução da resistência tanto à cefixima como à ceftriaxone desde 2013. Relativamente à Ciprofloxacina, em 2015, a resistência continuou com níveis muito elevados (49,4%) e foram semelhantes aos de 2014 (50,7%). A resistência foi maior em homens heterossexuais (59,7%) e menor em mulheres (41,8%). Quanto à Penicilina G, a prevalência de PPNG é a mais alta já observada no Euro-GASP, e tem havido desde 2010 uma tendência de aumento de resistência a este antibiótico <sup>(51)</sup>.

## 1.7 Tratamento

A capacidade que a *N. gonorrhoeae* tem em desenvolver resistência a múltiplas classes de antibióticos justifica a necessidade de contínua vigilância e monitorização.

Foi com base nesta necessidade urgente de controlar a AMR que em 2016 as Nações Unidas, na Assembleia Mundial de Saúde, aprovou a estratégia mundial no sector da saúde da Organização Mundial de Saúde (OMS) “Infeções Sexualmente Transmissíveis, 2016-2021” em que um dos principais objetivos desta estratégia é a redução de 90% da incidência a nível global de gonorreia <sup>(34)</sup>. Para atingir esse objetivo, a AMR gonocócica precisa ser abordada e como tal, foram implementados programas de vigilância da resistência aos antibióticos e atualizadas, pela OMS, as recomendações para o tratamento da infeção de forma a apoiar os países a atualizar as suas orientações para o tratamento da infeção gonocócica.

Estas orientações fornecem seis recomendações de regimes de tratamentos para situações clínicas específicas causadas pela *N. gonorrhoeae*. As recomendações resumidas na Tabela 5 para infeções gonocócicas de transmissão sexual aplicam-se a todos os adultos e adolescentes (10-19 anos de idade), incluindo indivíduos com HIV e populações específicas de maior risco para aquisição de ISTs. São igualmente fornecidas recomendações para a profilaxia e tratamento de *oftalmia neonatorum* causada pela *N. gonorrhoeae* <sup>(18)</sup>.

Tabela 5 - Recomendações da OMS para o tratamento de infecções gonocócicas

<b>Infeções vaginais e ano-rectais</b>
<b>Recomendação 1</b>
<p><b>Terapêutica dupla</b> (uma das seguintes):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ceftriaxona 250 mg intramuscular (IM) como dose única mais azitromicina 1 g oral como uma dose única</li> <li>• cefixima 400 mg por via oral, como dose única, além de azitromicina 1 g por via oral como dose única</li> </ul> <p><b>Terapêutica única</b> (uma das seguintes, com base em dados de resistência locais recentes e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ceftriaxona 250 mg IM como uma dose única</li> <li>• cefixima 400 mg por via oral como uma dose única</li> <li>• espectinomicina 2 g IM como uma dose única</li> </ul>
<b>Infeções orofaríngeas</b>
<b>Recomendação 2</b>
<p>Em adultos e adolescentes com infecção gonocócica orofaríngea a OMS sugere a terapêutica dupla</p> <p><b>Terapêutica dupla</b> (uma das seguintes)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ceftriaxona 250 mg IM como dose única + azitromicina 1 g oralmente como uma dose única</li> <li>• cefixima 400 mg por via oral, como dose única + azitromicina 1 g por via oral como dose única</li> </ul> <p><b>Terapêutica única</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ceftriaxona 250 mg IM como dose única</li> </ul>
<b>Tratamento após falência da terapêutica</b>
<b>Recomendação 3</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se a reinfeção for suspeita, voltar a tratar com um regime recomendado pela OMS, reforçar a abstinência sexual ou o uso do preservativo, e fornecer o tratamento do parceiro</li> <li>• Se a falha do tratamento ocorreu após o tratamento com um regime não recomendado pela OMS, voltar a tratar com um regime recomendado</li> <li>• Se a falha no tratamento ocorreu e se existem dados dos testes de suscetibilidade efetuar novo tratamento com base nos mesmos</li> <li>• Se a falha do tratamento ocorreu após tratamento com um antibiótico recomendado pela OMS em regime de terapêutica única, efetuar a terapia dupla recomendada</li> <li>• Se a falha do tratamento ocorreu após uma terapia dupla recomendada pela OMS, efetuar novo tratamento com uma das seguintes terapêuticas duplas: <ul style="list-style-type: none"> <li>- ceftriaxona 500 mg IM como dose única + azitromicina 2 g por via oral como dose única</li> <li>- cefixima 800 mg por via oral como dose única + azitromicina 2 g por via oral como dose única</li> <li>- gentamicina 240 mg IM como dose única + azitromicina 2 g por via oral como dose única</li> <li>- espectinomicina 2 g IM como dose única (se não infecção orofaríngea) mais azitromicina 2 g, por via oral, como dose única</li> </ul> </li> </ul>

<b>Oftalmia neonatorum</b>
<b>Recomendação 4</b>
Em neonatos com conjuntivite gonocócica, a OMS sugere uma das seguintes opções de tratamento: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ceftriaxona 50 mg / kg (máximo 150 mg) IM como dose única</li> <li>• kanamicina 25 mg / kg (máximo 75 mg) IM como dose única</li> <li>• espectinomicina 25 mg / kg (máximo 75 mg) IM como dose única</li> </ul>
<b>Recomendação 5</b>
Para todos os recém-nascidos a OMS recomenda profilaxia ocular tópica para prevenção da <i>oftalmia neonatorum</i>
<b>Recomendação 6</b>
Para a profilaxia ocular, a OMS sugere uma das seguintes opções para aplicação tópica para ambos os olhos imediatamente após o nascimento: <ul style="list-style-type: none"> <li>• cloridrato de tetraciclina 1% (pomada)</li> <li>• eritromicina a 0,5% (pomada)</li> <li>• solução de povidona iodo 2,5% (à base de água)</li> <li>• solução de nitrato de prata a 1%</li> <li>• cloranfenicol 1% (pomada).</li> </ul>

(Adaptado de <sup>(18)</sup>)

Relativamente às orientações da OMS de 2003 destacam-se as principais diferenças:

- As quinolonas já não são recomendadas para o tratamento da gonorreia devido ao alto nível de resistência;
- Estão incluídas recomendações para infeções orofaríngeas e para re-tratamento em situações de falência do mesmo.
- A terapêutica única é baseada em dados e mudanças de resistência locais;
- A terapêutica dupla é uma opção preferida à terapêutica única e surge como consequência do aparecimento de resistência às cefalosporinas de espectro estendido, ausência de antibióticos alternativos, pela sinergia *in vitro* e *in vivo* que tem vindo a ser demonstrada pela utilização de cefalosporinas de espectro estendido e Azitromicina e também pela possibilidade de permitir erradicar a infeção concomitante de *Chlamydia trachomatis*, que ocorre em 10-40% das situações de gonorreia <sup>(19)</sup>.

A tabela 6 apresenta as várias recomendações existentes para o tratamento da infeção gonocócica e reflete igualmente as diferenças relativas aos antibióticos utilizados, dosagem e regime terapêutico de acordo com o país, região ou organização.



Tabela 6 - Terapêutica antimicrobiana recomendada em infecções gonocócicas

País/ Região/Organização	Terapêutica	Situações especiais	Ano da Publicação
Europa	CRO 500mg IM + AZM 2g oral	-Se CRO indisponível, antibiótico injetável é impossível ou o paciente recusa: CFX 400mg oral + AZM 2g oral -Se AZM indisponível: CRO 500 mg IM	2013
EUA/CDC	CRO 250mg IM + AZM 1g oral	-Se CRO indisponível: CFX 400MG oral + AZM 1g oral	2015
Canadá	CRO 250mg IM + AZM 1g oral ou CFX 800 mg oral	-Se CRO indisponível: SPC 2 g IM + AZM 1g oral - Se o paciente for alérgico a cefalosporinas: AZM 2g oral	2013
Brasil	CIP 500 oral + AZM 500MG oral ou CRO 500MG IM + AZM 500MG ORAL	- Se o paciente for alérgico a cefalosporinas: AZM 2g oral - Se paciente <18 anos ou grávida: CRO 500MG IM + AZM 500MG ORAL	2015
Austrália	CRO 500mg IM + AZM 1g oral	Nenhuma	2016
OMS	CRO 250mg IM + AZM 1g oral OU CFX 400MG oral + AZM 1g oral	-Se existirem dados locais recentes de suscetibilidade é possível a terapêutica em dose única	2016

AZM-azitromicina; CRO-ceftriaxona; SPC-espectinomicina; CFX-cefixima; ESC-cefalosporinas de espectro estendido.

Adaptado de <sup>(26)</sup>.



Preconiza-se o tratamento da gonorreia de acordo com as recomendações de duas guidelines internacionais: CDC e OMS<sup>(25)</sup>. Na primeira é recomendada a ceftriaxona (250mg, IM) associada com Azitromicina (1g, oral), em dose única, como terapêutica de primeira linha para a infecção gonocócica aguda não complicada (uretrite, cervicite e proctite). A OMS aconselha uma dose única de ceftriaxona (250mg, IM) ou cefixima (400mg, oral) **associadas à azitromicina (1g, oral), em dose única** (Tabela 2).

Existem duas principais diferenças entre as duas *guidelines*, uma está relacionada com a possibilidade de utilização de terapêutica em dose única com um único antibiótico (Ceftriaxona ou Cefixime), se existirem dados locais recentes de suscetibilidade pela OMS e não pelo CDC. A outra diferença está relacionada com a recomendação, por parte do CDC, da terapêutica dupla (cefixima 400mg + azitromicina 1g) ser apenas utilizada como regime terapêutico alternativo. Segundo o CDC, uma dose oral de 400 mg de cefixima não atinge níveis sanguíneos bactericidas suficientemente elevados, nem sustentados, como uma dose de 250 mg de ceftriaxona, adicionalmente existe uma eficácia limitada da cefixima para o tratamento da gonorreia da faringe.

Para maximizar a adesão às terapêuticas recomendadas, reduzir eventuais complicações e quebrar a cadeia de transmissão, o CDC recomenda que os indivíduos tratados para gonorreia deverão ser instruídos para cessar a atividade sexual durante 7 dias após o tratamento e até que todas os parceiros sejam devidamente tratados. O CDC recomenda ainda que os indivíduos com diagnóstico de gonorreia deverão efetuar o despiste de outras ISTs (incluindo clamídia, sífilis e HIV) e realizar novo diagnóstico três meses após o tratamento, com o intuito de evitar um número elevado de reinfeções em homens e mulheres previamente tratados <sup>(36)</sup>.

#### 1.7.1 Investigação e desenvolvimento de novos antimicrobianos – Terapêuticas do Futuro

A frequência de infeções assintomáticas, a alteração rápida dos padrões de suscetibilidade, a variedade de mecanismos AMR e, paradoxalmente, o progresso inequívoco do desenvolvimento de anti-retrovirais altamente eficazes para o tratamento do HIV (que resulta num uso reduzido do preservativo) conduzem a uma cada vez maior disseminação de AMR em *N. gonorrhoeae* que é particularmente preocupante quando se tem em conta as opções de tratamento cada vez mais limitadas. Em fevereiro de 2017, a OMS definiu a *N. gonorrhoeae* como um dos microrganismos de “alta prioridade” para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos <sup>(39)</sup>.

Atualmente o *pipeline* da gonorreia é relativamente escasso, com apenas 3 novos candidatos a antibióticos em vários estádios de desenvolvimento clínico:

- Solitromicina: (Cempra Inc.) é um novo macrólido oral com atividade contra bactérias de Gram positivo e Gram negativo fastidiosas, incluindo *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* e *C. trachomatis*. Destina-se a 3 locais ribossômicos procarióticos diferentes e apresentou boa eficácia no estudo de Fase II, com 100% de eficácia para os casos de infeção genital, oral e retal em homens e mulheres. Concluído recentemente o ensaio clínico fase III<sup>(39,40)</sup>;

- Zoliflodacina: (Entasis Therapeutics) é um inibidor bacteriano de topoisomerase II com actividade contra vários microrganismos, incluindo *N. gonorrhoeae* / *C. trachomatis*. A Zoliflodacina demonstrou ser altamente eficaz *in vitro* contra uma grande coleção de isolados de *N. gonorrhoeae* geográfica e geneticamente diversificada. Os resultados de um ensaio de Fase II mostraram alta eficácia contra infeções urogenitais. Mais de 90% dos participantes eram do sexo masculino.

Completo o ensaio clínico de fase II<sup>(39,40)</sup>;

- Geoptidacina: (GlaxoSmithKline) é outro inibidor bacteriano da topoisomerase II, um novo triazaacenaftileno com boa atividade *in vitro* contra uma ampla gama de bactérias resistentes a medicamentos, incluindo MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente á meticilina), *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido) e *N. gonorrhoeae*. O ensaio de fase II foi concluído recentemente e as taxas de cura foram de 96,7% e 94,8% e foram alcançadas com doses de 1500 mg e 3000 mg, respetivamente. Como no anterior, mais de 90% dos participantes eram do sexo masculino. Completou recentemente o ensaio clínico de fase II <sup>(39,40)</sup>.

O desenvolvimento de novos antibióticos para o tratamento de *N. gonorrhoeae* não é muito atraente para a indústria farmacêutica. Os tratamentos são apenas por curtos períodos de tempo (ao contrário dos medicamentos para doenças crónicas) e tornam-se menos efetivos à medida que a resistência se desenvolve, o que significa uma constante necessidade de desenvolvimento de novos antibióticos.

Tendo em conta a questão acima referida, a “Drugs for Neglected Diseases initiative” (DNDi) e OMS lançaram em parceria a “Global Antibiotic Research and Development Partnership” (GARDP), uma organização de pesquisa e desenvolvimento de antimicrobianos sem fins lucrativos. A missão da GARDP para a *N. gonorrhoeae* é: acelerar o desenvolvimento de novos antibióticos, particularmente no apoio aos ensaios clínicos nas fases mais tardias (fase III e IV); avaliar o potencial dos antibióticos já existentes e suas possíveis combinações; explorar e desenvolver combinações de dose fixa e apoiar o desenvolvimento de recomendações simplificadas de tratamento <sup>(40,41)</sup>.

O desenvolvimento de uma vacina para *N. gonorrhoeae* seria uma mais-valia para controlar a disseminação das infeções gonocócicas a nível global mas não se prevê que uma vacina capaz de induzir uma proteção eficaz e duradoura esteja a breve trecho disponível. A dificuldade resulta tanto da elevada variabilidade genómica e antigénica da bactéria como pela lacuna da ausência de um modelo animal <sup>(25)</sup>.

## 2 - Justificação da dissertação e objetivos

A gonorreia é a segunda IST bacteriana mais notificada a seguir à infeção por *Chlamydia trachomatis*. As infeções por *N. gonorrhoeae* representam 78 milhões dos cerca de 357 milhões de novos casos de ISTs curáveis que ocorrem em todo o mundo a cada ano <sup>(42)</sup>. Segundo diferentes programas de vigilância epidemiológica, a incidência de infeções gonocócicas tem vindo a aumentar de forma consistente ao longo dos últimos anos a nível mundial e este aumento, parece ser indiferente ao nível económico dos diferentes países. Aliada à elevada incidência de infeções gonocócicas, existe igualmente uma elevada disseminação de resistências antimicrobianas. O acesso irrestrito a antimicrobianos, seleção inadequada e uso excessivo de antibióticos bem como mutações genéticas inerentes ao próprio microrganismo contribuíram para o desenvolvimento do padrão atual de resistência da *N. gonorrhoeae*.

O aumento da difusão das resistências aos antibióticos, essencialmente às cefalosporinas de largo espectro, associado a opções terapêuticas cada vez mais limitadas, conduzem ao aumento das infeções gonocócicas, em particular das não tratadas por falência do tratamento, que por sua vez podem levar a complicações graves como doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e infertilidade (tanto feminina como masculina), que resultam numa elevada morbilidade e custo económico a nível global. Perante o referido, é inequívoco que a *N. gonorrhoeae* foi, e continua a ser, um importante problema em termos de saúde pública.

Em Portugal os dados epidemiológicos sobre ISTs, nomeadamente a gonorreia, são escassos e pouco fundamentados por vários motivos, entre eles a subnotificação até 2014, a maior tradição de procura das consultas privadas de ginecologia ou urgência generalista de hospitais em relação a serviços com consulta dedicada a IST.

Foi com base no supramencionado que se considerou pertinente, tanto do ponto de vista epidemiológico como clínico, estudar a frequência e o perfil de resistência numa determinada população em ambulatório.

Adicionalmente, considerou-se relevante avaliar possíveis alterações ao nível genético que possam ocorrer em estirpes de *N. gonorrhoeae* após a transmissão entre parceiros sexuais e durante o processo de infeção homem/mulher, tendo em conta as diferentes características inerentes aos hospedeiros dos dois géneros. A caracterização detalhada das estirpes de *N. gonorrhoeae* foi realizada recorrendo a uma tecnologia de ponta, técnica de Sequenciação Total do Genoma (Whole Genome Sequencing - WGS).

## Objetivos

Esta dissertação teve como objetivo geral estudar a frequência de infecções gonocócicas e o perfil de resistências numa população de utentes que recorreu a um laboratório de ambulatório num período de 10 anos e adicionalmente, investigar possíveis alterações ao nível genético que possam ocorrer em *N. gonorrhoeae* após a transmissão entre parceiros sexuais.

- 1) Avaliar a frequência de infeções por *N. gonorrhoeae* tendo em conta as variáveis género e idade;
- 2) Estudar o perfil de resistência aos antibióticos: Penicilina, Ceftriaxona e Ciprofloxacina;
- 3) Estudo genético de estirpes provenientes de pares de parceiros sexuais.

## 3 - Material e Métodos

### 3.1 Caraterização da população em estudo

**a)** Estudo da frequência de infeções por *N. gonorrhoeae* e o perfil de resistência aos antimicrobianos

Foram analisadas 163 976 amostras, 5 458 exsudados uretrais de homens e 158 518 exsudados vaginais nos utentes que recorreram a um laboratório de ambulatório (Dr. Joaquim Chaves, Laboratório de Análises Clínicas) entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2016. Na análise retrospectiva dos processos, foram analisadas as variáveis género e idade.

**b)** Estudo genético de estirpes provenientes de pares de parceiros sexuais

Foram analisadas 9763 amostras, 304 exsudados uretrais de homens e 9459 exsudados vaginais nos utentes que recorreram a um laboratório de ambulatório (Dr. Joaquim Chaves, Laboratório de Análises Clínicas) entre 1 de Março e 31 de Agosto de 2017. Na análise retrospectiva dos processos, foram analisadas as variáveis género e idade.

### 3.2 Colheita e conservação das amostras

#### Exsudados vaginais

A colheita foi realizada preferencialmente de manhã, antes de urinar, ou no mínimo três horas após a última micção. Foi colhido o exsudado com uma zaragatoa e a mesma foi colocada no meio de transporte (Kit Stuart). De seguida, foi utilizada outra zaragatoa e foram efetuados dois esfregaços em lâmina. Todas as amostras foram analisadas dentro do período de máxima estabilidade, máximo doze horas à temperatura ambiente.

#### Exsudados uretrais

A colheita foi realizada preferencialmente de manhã, antes de urinar, ou no mínimo três horas após a última micção. A uretra foi pressionada de modo a estimular a saída de corrimento e o mesmo foi colhido com uma zaragatoa e foram efetuados dois esfregaços. Foi utilizada outra zaragatoa para colher mais corrimento e foi colocada em meio transporte (Kit Stuart). Todas as amostras foram analisadas dentro do período de máxima estabilidade, máximo doze horas à temperatura ambiente.

### 3.3 Cultura e identificação dos isolados de *Neisseria gonorrhoeae*

As amostras colhidas foram semeadas em meio gelose chocolate PolyVitest VCAT3® (*Biomérieux*) e incubadas a 35-37°C em 5% CO<sub>2</sub> durante 48h. De seguida, procedeu-se à observação por microscopia ótica dos esfregaços corados pelo método de Gram (anexo 1) e, a observação de diplococos de Gram negativo intracelulares ou extracelulares nos exsudados corados poderá ser indicativo da presença de *N. gonorrhoeae*.

Nos casos em que se observou crescimento bacteriano, as colónias sugestivas foram testadas com as provas de catalase (anexo 2) e oxidase (anexo 3) e o resultado positivo para ambos os testes, confirmaram o género, *Neisseria sp.*

Após a confirmação do género, as colónias positivas foram novamente repicadas para o meio de gelose chocolate PolyVitest® (*Biomérieux*) e incubadas em estufa por um período de 24 horas, conforme descrito anteriormente. Terminado o segundo período de incubação, foram realizados testes de confirmação da espécie recorrendo à utilização de cartas de ID VITEK® 2 (NH test Kit - *Biomérieux*) que permitiram a identificação do microrganismo.

### 3.4 Estudo de suscetibilidade aos antibióticos

O perfil de resistências aos antimicrobianos foi obtido pela realização de testes de suscetibilidade, método de difusão Kirby-Bauer e método de concentração mínima inibitória (MIC-Etest) em Gelose GC. O método de suspensão direta das colónias, equivalente a 0,5 da escala de McFarland, foi feita a partir dos procedimentos descritos no *Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)*<sup>(52)</sup>.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as normas CLSI (anexo 4) e, foram testados os seguintes antibióticos: Penicilina, Ciprofloxacina e Ceftriaxona.

### 3.5 Estudo genético de estirpes provenientes de pares de parceiros sexuais

O estudo genético foi realizado em estirpes obtidas a partir de amostras como referido em 3.2 e isoladas de acordo com o descrito em 3.3.

Quatro estirpes identificadas como *N. gonorrhoeae* provenientes de culturas puras e recentes foram transferidas assepticamente para tubos CRYOBANK® (MAST®) a uma densidade equivalente ao padrão 3 ou 4 de *McFarland* e de seguida congeladas a -70°C. Estas amostras foram posteriormente enviadas para o Departamento de Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) para a realização da sequenciação do genoma da *N. gonorrhoeae*. Para a realização da mesma, foi aplicada a técnica de sequenciação total do genoma (*Whole Genome Sequencing* – WGS) no equipamento MiSeq Illumina®. Os genomas das quatro estirpes foram reconstruídos utilizando o software SPAdes<sup>(67)</sup> e as sequências genómicas foram anotadas (software Prokka<sup>(68)</sup>) com base no repositório de dados do National Center for Biotechnology (NCBI) de forma a conseguir-se identificar as zonas codificantes (genes). Posteriormente foi realizada a comparação par a par recorrendo ao alinhamento das sequências utilizando software específicos (*Snippy* e *Mauve*<sup>(66)</sup>).

### 3.6 Tratamento e análise dos dados

A informação reunida foi organizada numa base de dados eletrónica do laboratório e foi utilizado o *Software Microsoft Excel* para o tratamento de dados estatísticos e apuramento dos resultados.

## 4 – Resultados

### 4.1 Distribuição das amostras totais relativamente ao género

No período compreendido entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2016 obteve-se um total de 163 976 amostras de utentes, 158 518 (97%) exsudados vaginais e 5 458 (3%) exsudados uretrais de homens (Figura 6).

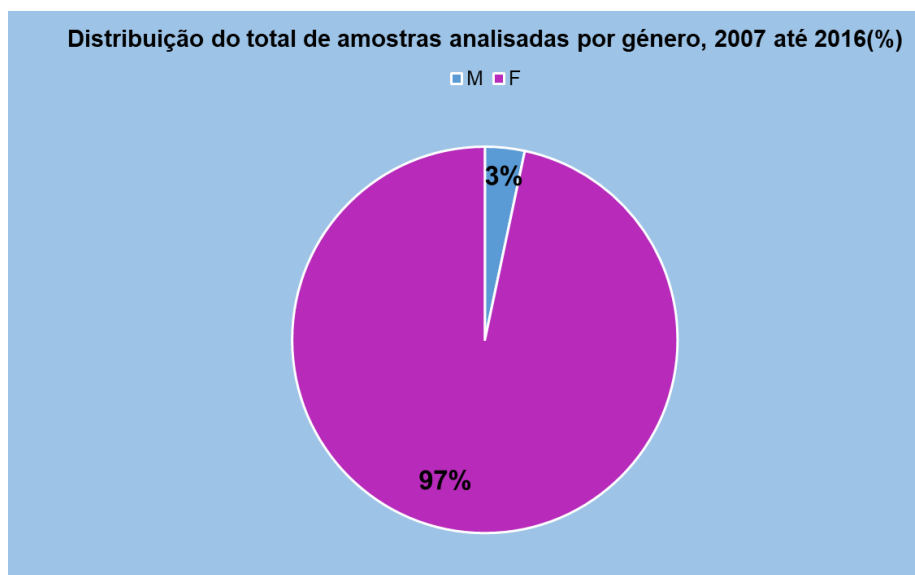


Figura 6 - Distribuição do total de amostras analisadas por género

A figura 7 ilustra o total de amostras analisadas e a sua distribuição por género em cada ano do período de estudo, e reflete de forma clara a diferença acentuada do número de amostras de exsudados vaginais quando comparada com as amostras de exsudados uretrais de homens, esta diferença é constante ao longo dos 10 anos de estudo.

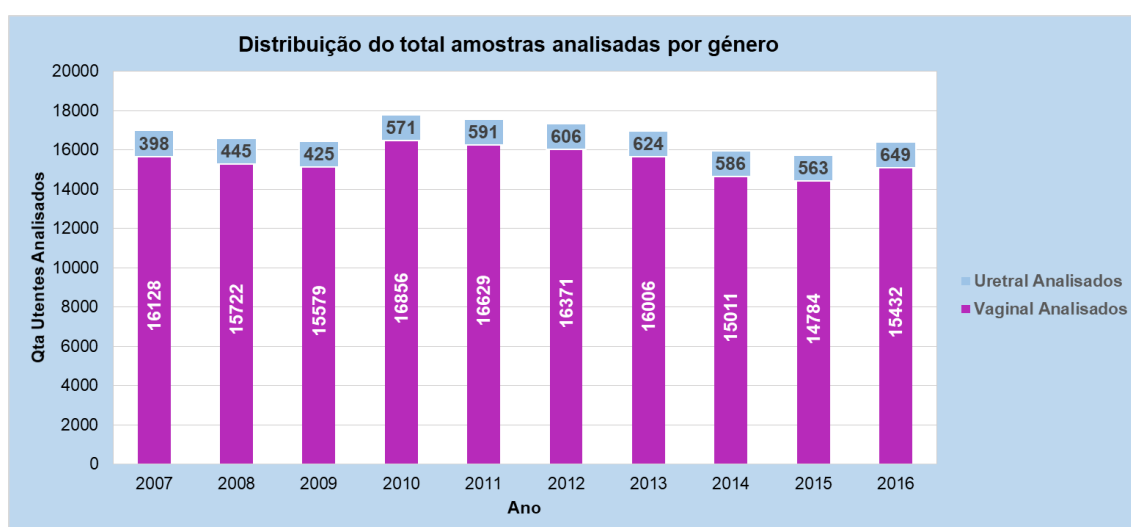


Figura 7 - Distribuição do total de amostras analisadas por género e ano, 2007-2016

## 4.2 Frequência de infecções gonocócicas

### 4.2.1 Frequência de infecções gonocócicas por género

Do total de amostras analisadas 163 976 obtiveram-se 444 (0,27%) amostras positivas para *N. gonorrhoeae* (359 homens - 81% e 85 mulheres – 19%) com uma maior frequência de infecções no homem (0,22%) do que na mulher (0,05%).

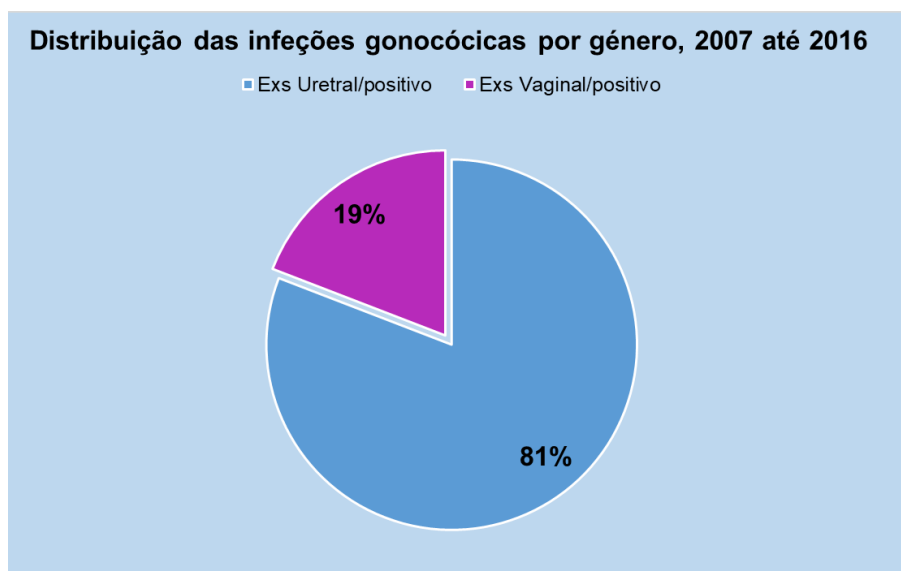


Figura 8 - Distribuição das infecções gonocócicas por género, 2007-2016

A figura 9 exibe a frequência de infecções por *N. gonorrhoeae* por ano, por género e total (soma de homens e mulheres) entre 2007 e 2016 e, em termos globais, observou-se um aumento muito significativo da frequência de infecções de 2007 (20 casos - 0,12%) para 2016 (92 casos - 0,57%). De salientar o pico ocorrido em 2016, este foi o ano em que ocorreram maior número de infecções dos dez anos estudados. Pode observar-se um aumento do número de infecções de 2007 até 2012, em 2013 há um decréscimo de diagnósticos de gonorreia para valores semelhantes a 2011, seguindo-se de um novo recrudescimento a partir de 2014.

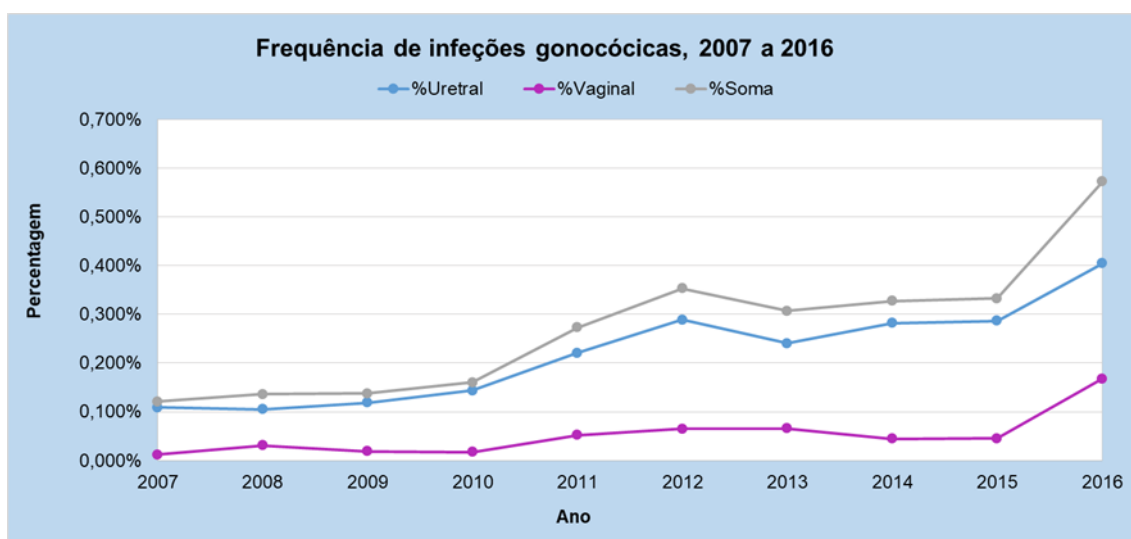


Figura 9 - Comparação da frequência de infecções por *N. gonorrhoeae* no sexo feminino, no sexo masculino e total (feminino e masculino), 2007-2016



Das 5 458 amostras de exsudados uretrais de homens estudadas obtiveram-se 359 (6,6%) amostras positivas para *N.gonorrhoeae* e observou-se um aumento de 4,5% para 10,0% de 2007 para 2016 (Figura 10).

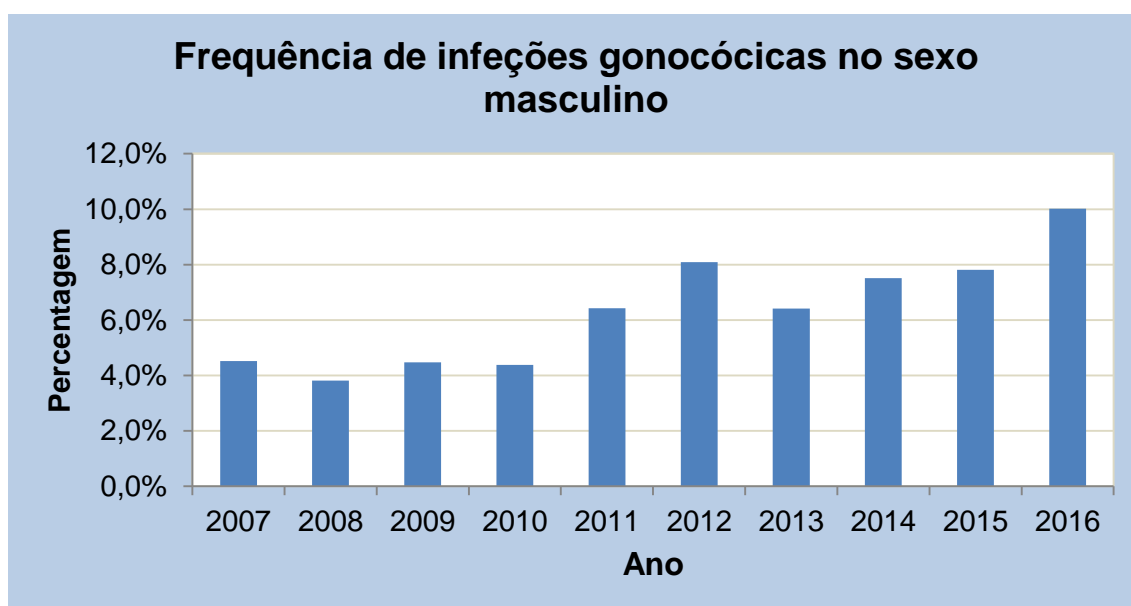


Figura 10 - Frequência de infecções por *N. gonorrhoeae* no sexo masculino, 2007-2016

Relativamente aos exsudados vaginais, das 158 518 amostras obtiveram-se 85 (0,054%) amostras positivas e verificou-se um aumento de 0,012% para 0,175% de 2007 para 2016. No entanto, este aumento é mais evidente no ano de 2015 (0,047%) para o ano de 2016 (0,175), como se pode observar pelo gráfico da figura 11.

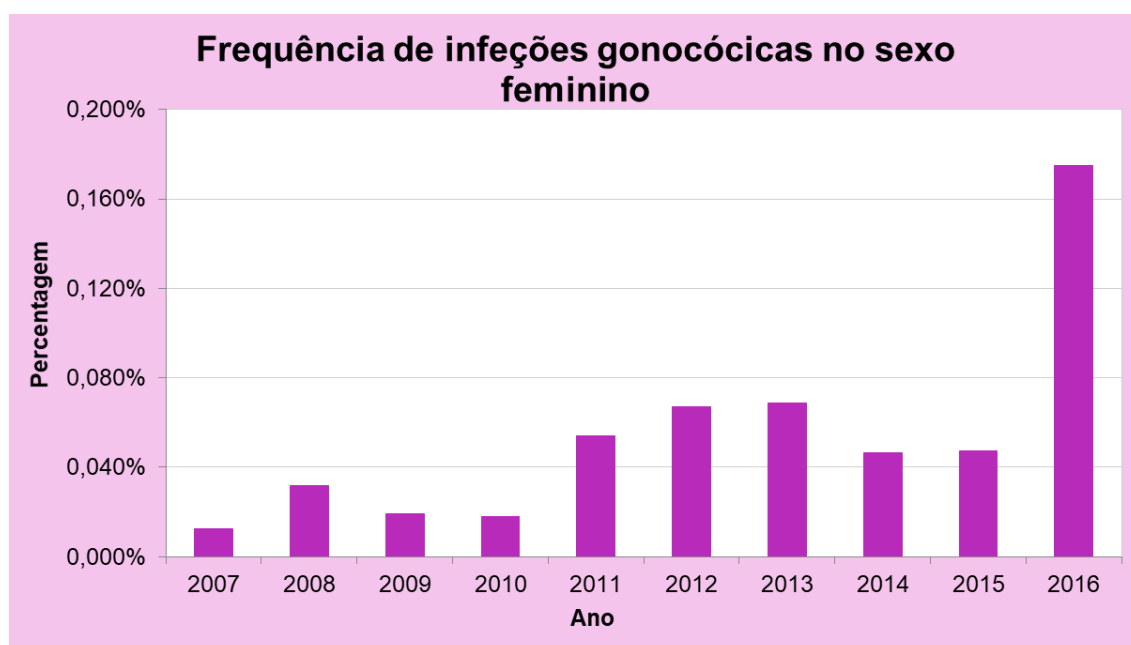


Figura 11 - Frequência de infecções por *N. gonorrhoeae* no sexo feminino, 2007-2016

#### 4.2.2 Frequência de infeções gonocócicas por grupo etário

A figura 12 compara a frequência do total de infeções gonocócicas ocorridas em 2007 e 2016 por grupo etário. Verificou-se que a maior proporção de infeções por *N. gonorrhoeae* ocorreu nos grupos etários 20-24 e 25-34 anos e esta evidência é comum nos dois anos analisados (65,0% - 2007 e 53,3% - 2016). Contudo, foi no grupo dos 20-24 anos onde ocorreram o maior número de casos de infeção, tanto em 2007 como em 2016. Salienta-se o aumento do número de infeções por gonorreia de 2007 para 2016, quer entre os 15 e os 19 anos (10,0% para 15,2%) como em indivíduos com mais de 45 anos (5,0% para 12,0%).

De referir que foi seguido o mesmo critério de grupo etário que o utilizado pelo ECDC<sup>(43)</sup>.

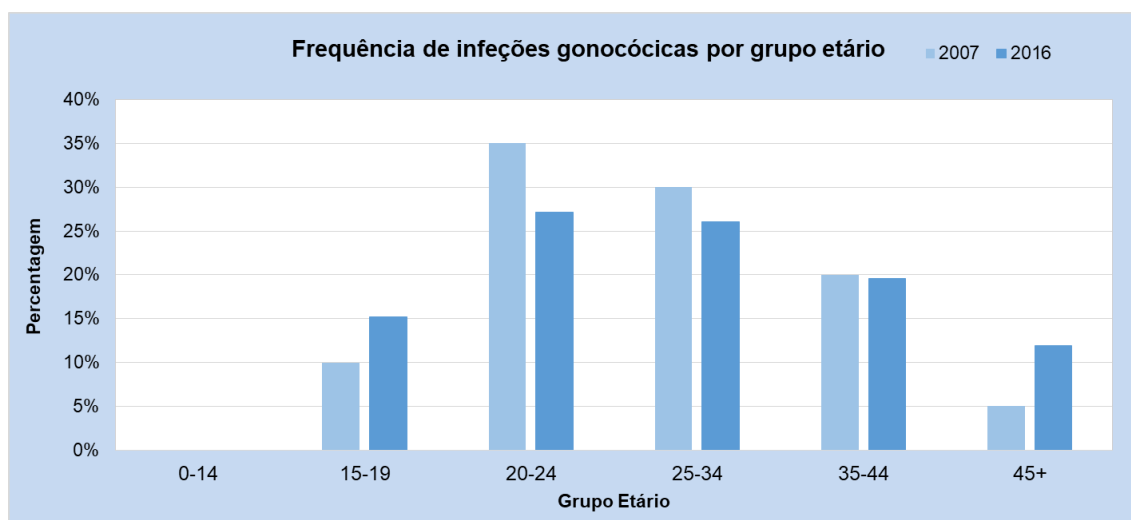


Figura 12 - Comparação da frequência de infeções gonocócicas por grupo etário em 2007 e 2016

#### 4.2.3 Frequência de infeções gonocócicas por género e grupo etário

Os gráficos 13 e 14 ilustram a distribuição do número casos de infeções gonocócicas ao longo do período de estudo em homens e mulheres. Pela comparação dos dois gráficos é de salientar que, de uma forma relativamente consistente ao longo dos 10 anos, o grupo com maior número casos de infeções gonocócicas no sexo masculino é o grupo 25-34 anos enquanto no sexo feminino é o grupo 20-24 anos.

De referir que no grupo etário dos 0-14 anos apenas ocorreu um infeção gonocócica ao longo do período de estudo e foi um utente do sexo masculino.

O aumento do número de casos de infeções por *N. gonorrhoeae* em 2016 foi muito evidente em ambos os sexos e ocorreu em todos os grupos etários.

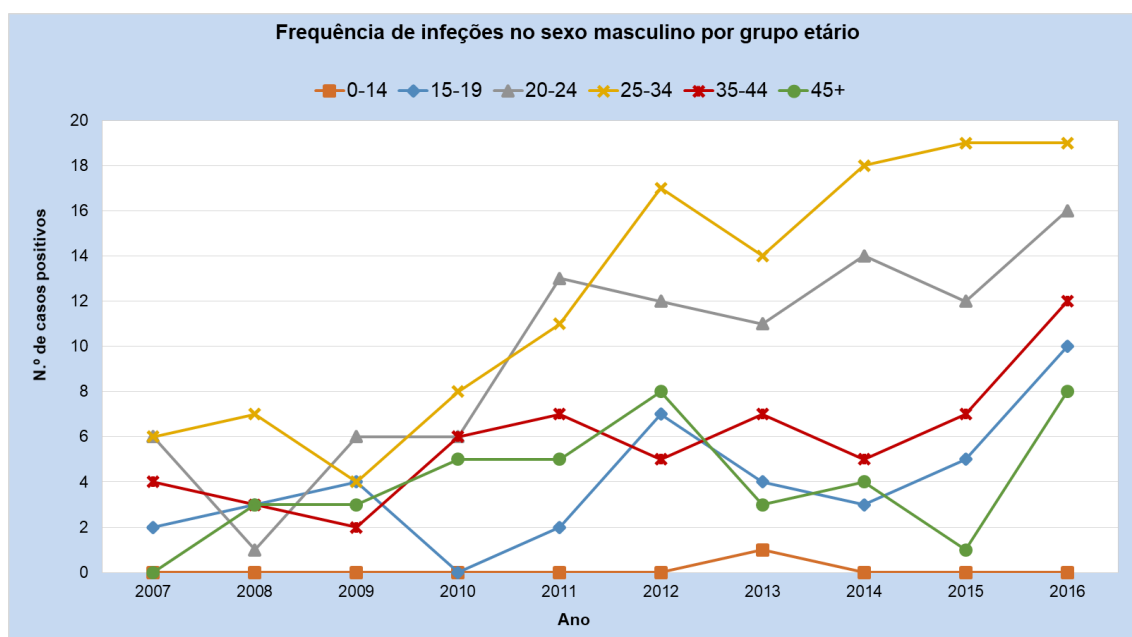


Figura 13 – Número casos de infecções gonocócicas no sexo masculino por grupo etário, 2007 e 2016

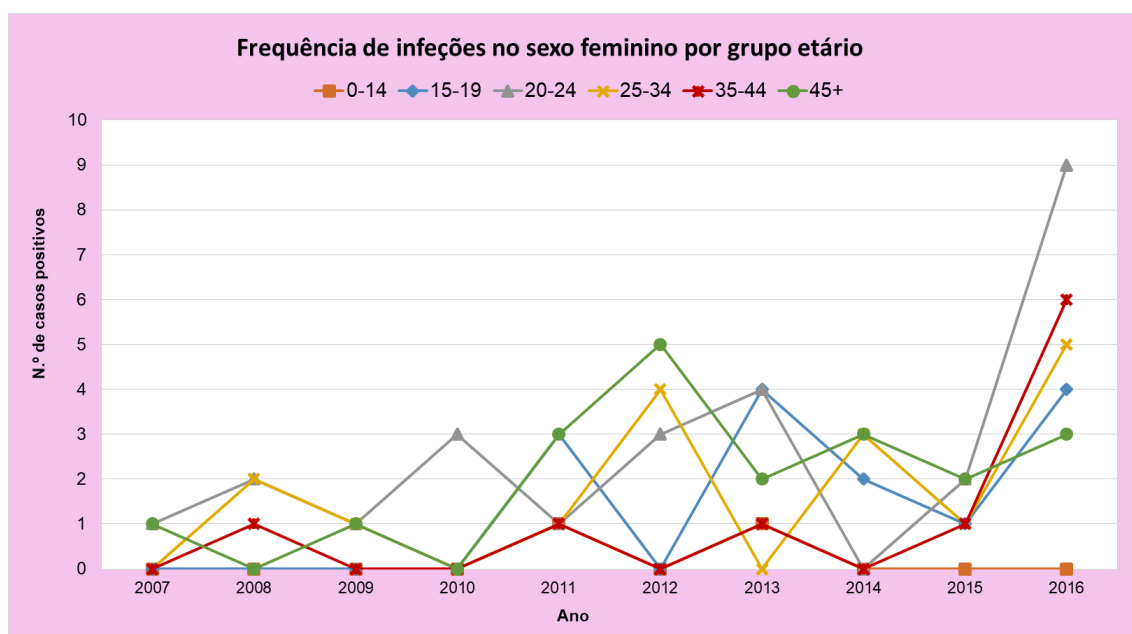


Figura 14 – Número de casos de infecções gonocócicas no sexo feminino por grupo etário, 2007 e 2016

O gráfico da figura 15 representa a frequência (tendo em conta o número total de amostras) de infecções no sexo feminino e masculino em 2016 e também evidência que nas mulheres a maior frequência de infecções por gonorreia ocorre em idades mais jovens que nos homens.

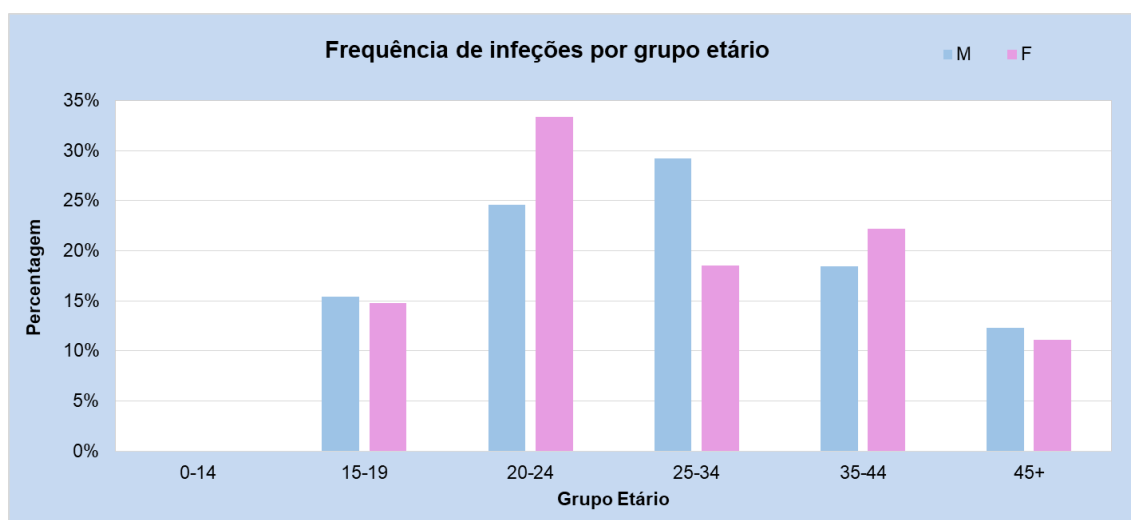


Figura 15 - Frequência de infecções gonocócicas no sexo masculino e feminino por grupo etário em 2016

#### 4.3 Estudo de suscetibilidade aos antibióticos

Foram realizados estudos de suscetibilidade aos antibióticos nas 444 estirpes de *N. gonorrhoeae* isoladas no laboratório entre Janeiro de 2007 e Dezembro de 2016. O estudo de suscetibilidade aos antimicrobianos demonstrou um aumento evidente da resistência quer à Ciprofloxacina (45% para 70%) como à Penicilina (65% para 83%) de 2007 para 2016, respetivamente. No que se refere à Ceftriaxona, não foram encontradas resistências (figura 16).

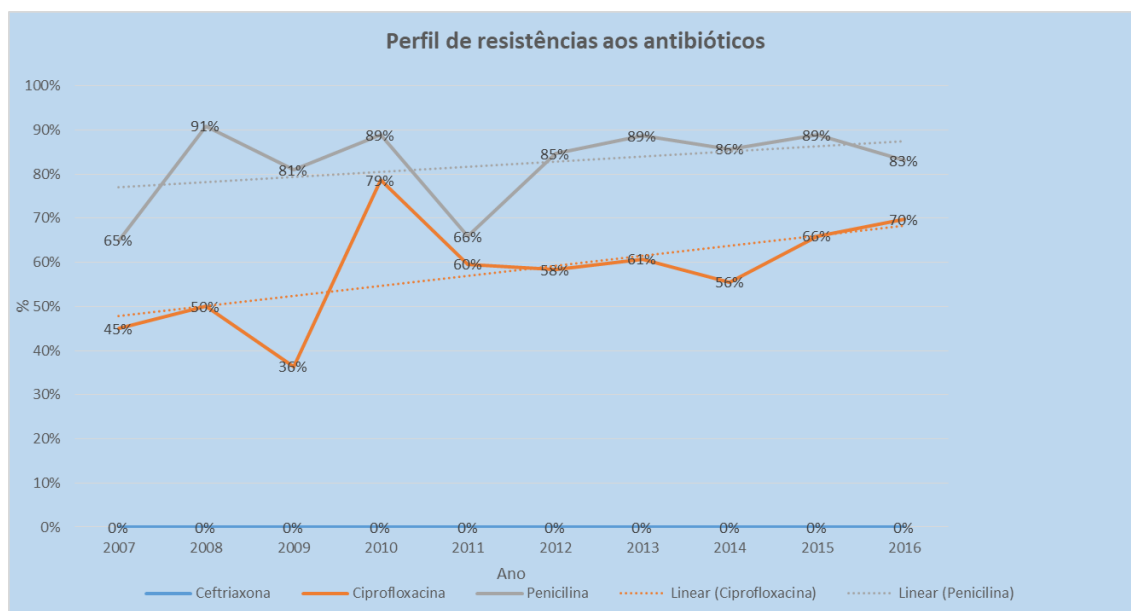


Figura 16 - Perfil de resistência aos antibióticos, 2007-2016

#### 4.4 Estudo genético das estirpes provenientes de pares de parceiros sexuais

##### 4.4.1 Seleção de parceiros sexuais dos utentes com infeção gonocócica

Entre 1 de Março e 31 de Agosto de 2017 foram analisadas 9763 amostras (304 exsudados uretrais de homens e 9459 exsudados vaginais) e foram identificados 36 casos de gonorreia (30 homens – 83% e 6 mulheres – 17%). Os 36 utentes foram contactados telefonicamente com o objetivo de solicitar a ida do parceiro ao laboratório com o intuito de se realizar a respetiva pesquisa de *N. gonorrhoeae*. Dos 36 indivíduos contactados, 16 referiram não ter parceiro fixo, 8 informaram que a terapêutica já tinha sido realizada tanto ao próprio como ao parceiro, 6 acabaram por não ser contactados por serem utentes provenientes de entidades externas ao laboratório e apenas 6 utentes acederam à convocatória e os respetivos parceiros efetuaram a pesquisa de *N. gonorrhoeae* (figura 17).

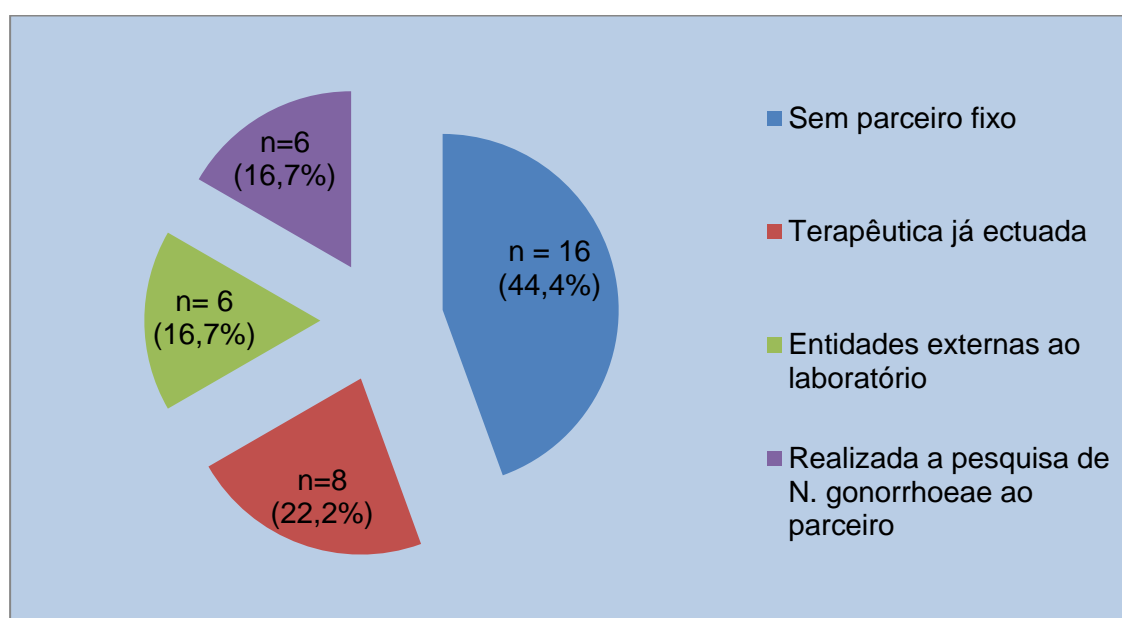


Figura 17 - Distribuição da informação dos 36 utentes com infeção gonocócica

Das seis amostras colhidas dos parceiros sexuais para pesquisa de *N. gonorrhoeae*, apenas duas foram positivas, sendo as restantes negativas tanto no exame cultural como no exame microscópico a fresco de esfregaço corado pelo método de Gram. Estas duas amostras positivas para *N. gonorrhoeae*, à semelhança do procedimento que tinha sido efetuado para os respetivos parceiros, foram congeladas a -70°C para posterior envio para o Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) para a realização da sequenciação total do genoma da *N. gonorrhoeae*.

### Dados referentes aos dois pares de parceiros sexuais estudados:

- Par de parceiros sexuais ANM: Homem de 35 anos e parceira de 34 anos (grávida) com aproximadamente um mês de intervalo entre as colheitas. O resultado do teste de suscetibilidade foi igual para ambos: Sensibilidade à ceftriaxona, ciprofloxacina e cefixima; Resistência à Penicilina.
- Par de parceiros sexuais PVE: Homem de 22 anos e parceira de 21 anos com aproximadamente uma semana de intervalo entre as colheitas. O resultado do teste de suscetibilidade foi igual para ambos: Sensibilidade à ceftriaxona e cefixima; Resistência à ciprofloxacina e penicilina.

#### 4.4.2 Sequenciação total do genoma das estirpes dos pares de parceiros sexuais

A análise da sequência genética total do cromossoma de cada estirpe confirmou que os parceiros estavam de facto infetados com a mesma estirpe de *N. gonorrhoeae*. A comparação dos genomas totais de cada par de parceiros revelou a inexistência de perda ou ganho de material genético, isto é, após a transmissão e durante o processo de infeção da parceira a estirpe não adquiriu nem perdeu genes, mantendo a mesma estrutura cromossômica. No entanto, foi possível observar diferenças genéticas sob a forma de mutações pontuais (substituição de um nucleótido ou pequenas deleções ou inserções) quando se comparou as estirpes dos mesmos parceiros.

A análise da sequência genética total do genoma permitiu determinar a sequência tipo NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequencing typing) das quatro estirpes de *N. gonorrhoeae*. O método NG-MAST é um sistema de tipagem molecular específico para *N. gonorrhoeae* que se baseia na análise da sequência parcial dos dois genes mais variáveis de *N. gonorrhoeae* (*por* e *tbpB*), o método possibilita identificar grupos de indivíduos infetados por um mesmo tipo bacteriano, relacionados entre si num curto espaço de tempo. No NG-MAST, as sequências *por* e *tbpB* obtidas para cada estirpe foram comparadas com os alelos existentes na aplicação NG-MAST <sup>(65)</sup>.

No par ANM foi identificado o tipo bacteriano ST7445 e no par PVE foi identificado um novo tipo bacteriano ainda não registado na base de dados NG-MAST (tabela 7).

Tabela 7 - Resultados relativos ao NG-MAST

Estirpe	Tamanho do genoma montado	NG-MAST (ST)	Alelo gene <i>por</i>	Alelo gene <i>tbpB</i>
ANM Masculino	2103468	7445	28	24
ANM Feminino	2097404	7445	28	24
PVE Masculino	2143494	Novo ST	Novo alelo	27
PVE Feminino	2145933	Novo ST	Novo alelo	27

### Comparação das estirpes do par de parceiros ANM

Pela comparação dos resultados obtidos pela sequenciação total do genoma das estirpes dos pares de parceiros ANM podemos verificar que as estirpes apresentaram três diferenças genéticas as quais afetam três genes diferentes que codificam para 3 proteínas membranares (tabela 8). Os genes afetados por estas alterações são genes que codificam proteínas membranares (a sulfatase e duas proteínas de opacidade), que poderão estar envolvidas na resposta aos diferentes ambientes que a *N. gonorrhoeae* infeta, isto é o trato genital masculino ou feminino.

Tabela 8 - Resultados da sequenciação do par de parceiros ANM

Comparação do par de parceiros ANM				
Tipo de alteração	Perfil Nucleotídico em ANM Masculino	Perfil Nucleotídico em ANM Feminino	Produto do gene afetado	Posição no gene
Inserção	TGG	TGGG	Sulfatase (proteína membranares)	Dentro da região codificante
Deleção	GAAGA(10x)	GAAGA(9x)	Proteína de opacidade (proteína membranares)	Dentro da região codificante
Inserção	CTTCT(10x)	CTTCT(11x)	Proteína de opacidade (proteína membranares)	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	T	C	Adesina (Maf) (proteína membranares)	Dentro da região codificante
Inserção	TCCCCCCCCCCCCG	TCCCCCCCCCCCCG	Glycosyltransferase (EpsE) (proteína membranares)	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	C	G	Proteína associada a fago	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	T	C		Dentro da região codificante
Mutação Pontual	G	A		Dentro da região codificante
Mutação Pontual	C	T	Proteína de opacidade (proteína membranares)	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	C	T		Dentro da região codificante
Mutações Pontuais	ATGAACA	ACCGTTC	Pili (proteína membranares)	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	T	C	Proteína Hipotética	Dentro da região codificante

Legenda:

Verde: Diferenças genéticas fixas entre as duas estirpes (masculina e feminina) que afetam genes codificantes;

Azul: Misturas encontradas em cada estirpe.

### Comparação das estirpes do par de parceiros PVE

A comparação da sequência genética da estirpe masculina e feminina do par PVE permitiu evidenciar nove diferenças genéticas contudo, apenas três destas diferenças afetam genes em regiões codificantes ou reguladoras sendo as restantes alterações menos significativas já que ocorreram em zonas entre genes sendo o seu impacto imprevisível.

As três alterações evidenciadas a verde na tabela 9 resultam de deleções no perfil de nucleótidos e duas delas afetam a sequência codificante de dois genes diferentes tendo implicações diretas na estrutura das proteínas correspondentes (uma proteína membrana - HpuA e uma proteína hipotética). A outra alteração afeta a sequência reguladora de outro gene com possíveis implicações na expressão da proteína que este codifica (antígeno FetA – proteína de membrana).

Tabela 9 - Resultados da sequenciação do par de parceiros PVE

Comparação do par de parceiros PVE				
Tipo de alteração	Perfil Nucleotídico em PVE Masculino	Perfil Nucleotídico em PVE10507 Feminino	Produto do gene afetado	Posição no gene
Deleção	CGGGGGGGGGGT	CGGGGGGGGGT	Componente de receptor de hemoglobina (HpuA) (proteína membrana)	Dentro da região codificante
Deleção	GAAGA(14x)	GAAGA(9x)	Proteína Hipotética (proteína membrana)	Dentro da região codificante
Deleção	ACCCCCCCCCCG	ACCCCCCCCCCG	Antígeno (FetA) (proteína membrana)	Na região reguladora do gene
Mutações pontuais	GG	AA	n.a. (região não codificante)	n.a. (região não codificante)
Mutação Pontual	A	G	n.a. (região não codificante)	n.a. (região não codificante)
Mutação Pontual	A	G	n.a. (região não codificante)	n.a. (região não codificante)
Mutações pontuais	TTACTG	TCCA	n.a. (região não codificante)	n.a. (região não codificante)
Inserção	CTTTTTTTTA	CTTTTTTTTA	n.a. (região não codificante)	n.a. (região não codificante)
Deleção	GCCCCCA	GCCCCA	n.a. (região não codificante)	n.a. (região não codificante)
Mutação Pontual	C	T	Proteína de opacidade (proteína membrana)	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	A	C		Dentro da região codificante
Mutações pontuais	ACTTT	GTTTC		Dentro da região codificante
Inserção	GAAGA(15x)	GAAGA(16x)	Proteína de opacidade (proteína membrana)	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	G	A	Proteína associada a fago	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	C	T	Proteína associada a fago	Dentro da região codificante
Mutações pontuais	GCG	TCT		Dentro da região codificante
Inserção	CGGGGGGGA	CGGGGGGGGGA	Proteína Hipotética	Dentro da região codificante
Mutação Pontual	G	T	Proteína Hipotética	Dentro da região codificante

Legenda: Verde: Diferenças genéticas fixas entre as duas estirpes que afetam genes codificantes

Cinza: Diferenças genéticas fixas entre as duas estirpes que não afetam genes codificantes

Azul: Misturas encontradas em cada estirpe.



Após a análise dos resultados da sequenciação quer do par de parceiros ANM quer do par PVE, outras considerações importantes a ter em conta prendem-se com alterações genéticas que, não estando diretamente relacionados com a infeção diferencial homem/mulher, poderão advir simplesmente do processo adaptativo de *N. gonorrhoeae* ao ser Humano, alterações evidenciadas a azul tanto na tabela 8 como na tabela 9. Assim, dado o facto de se estar a sequenciar uma população de bactérias e não uma bactéria única, foi possível observar que a *N. gonorrhoeae* mantém uma certa diversidade genética durante o processo infeccioso do Homem. Isto é, para cada uma das 4 “populações”/estirpes de *N. gonorrhoeae* colhidas dos 4 indivíduos, observou-se que a bactéria mantinha diversidade genética para determinados nucleótidos, e que estes estavam localizados em genes particulares que codificam: três proteínas de opacidade (factor de virulência da *N. gonorrhoeae*); 3 proteínas membranares (Pili, Maf, Glicosyltransferase) que estarão em contacto direto com o ambiente que a bactéria infeta); e 4 proteínas associadas a fagos. Havendo um paralelo entre as 4 estirpes no que diz respeito aos genes que mantêm esta diversidade genética, poder-se-á supor que estes são os alvos que a bactéria necessita de modificar de forma a sobreviver durante a infeção do Homem, quer seja para combater o sistema imunitário quer seja para combater as pressões do ambiente que infeta.

## 5 – Conclusões e Discussão

### 5.1 Distribuição das amostras totais relativamente ao género

Do total de amostras analisadas, 97% pertencem a exsudados vaginais de mulheres e apenas 3% a exsudados uretrais de homens. É uma diferença muito significativa entre as amostras femininas e masculinas e, muito provavelmente esta diferença deve-se ao maior número de mulheres que realizam o exsudado vaginal por rotina e sem sintomatologia associada, nomeadamente as grávidas (a Direção Geral de Saúde recomenda a pesquisa do *Streptococcus*  $\beta$  hemolítico do grupo B no exsudado vaginal e anal a todas as grávidas entre as 35 e 37 semanas) <sup>(53)</sup>. Por outro lado, os homens realizam o exsudado uretral, na grande maioria das situações, apenas quando têm sintomatologia associada.

### 5.2 Frequência de infeções gonocócicas

Os resultados obtidos revelaram um aumento evidente das infeções por *N. gonorrhoeae* de 2007 para 2016. Em 2016, o número de infeções gonocócicas detetadas na população de utentes do laboratório foi aproximadamente cinco vezes superior ao número de infeções ocorridas em 2007. Os dados deste estudo estão em linha com os dados reportados pelo ECDC<sup>(16)</sup>, CDC<sup>(26)</sup> e OMS<sup>(14)</sup> que revelam um aumento muito significativo no número de infeções por *N. gonorrhoeae* nos últimos anos. Fatores como o aumento do número de viajantes, migrantes e comportamentos sexuais de risco, nomeadamente o uso inconsistente do preservativo, podem ser responsáveis pelo aumento das infeções gonocócicas ao longo do período do estudo.

#### 5.2.1 Frequência de infeções gonocócicas por género

Das 444 infeções gonocócicas detetadas no laboratório, 81% foram diagnosticadas em homens e apenas 19% em mulheres apesar de 97% das amostras totais serem provenientes de mulheres. Muito provavelmente esta diferença na frequência de infeção gonocócica entre os sexos estará relacionada com o diagnóstico laboratorial ser realizado maioritariamente em homens sintomáticos e eles serem sintomáticos na grande maioria das infeções por gonorreia <sup>(14)</sup>.

Segundo o ECDC, a infeção por *N. gonorrhoeae* tende a ser mais comum em homens, e isso tornou-se evidente quer num estudo que se realizou anteriormente <sup>(69)</sup>, como em outros estudos que foi possível pesquisar.

É evidente o aumento do número de infeções gonocócicas detetadas, tanto em homens como em mulheres, em 2016, comparativamente aos restantes anos. Contudo, este aumento foi, sem dúvida, mais pronunciado nas mulheres e muito provavelmente a alteração dos comportamentos sexuais neste género poderá ser uma das justificações.

Nos últimos anos, as mulheres aumentaram o seu comportamento sexual de risco (particularmente nos países desenvolvidos) onde o comportamento de risco nos homens permaneceu intato. Adicionalmente, a vulnerabilidade biológica da mulher devido ao seu nicho genital, aumenta o risco de aquisição de ISTs, nomeadamente da infeção gonocócica <sup>(63)</sup>.

### 5.2.2 Frequência de infecções gonocócicas por grupo etário e género

Comparando o ano de 2007 e 2016 relativamente ao número total de infecções gonocócicas ocorridas por grupo etário, verificou-se que nestes dois anos a infeção gonocócica é superior no grupo etário dos 20-24 anos e observou-se igualmente, de 2007 para 2016, um aumento de infeções nos grupos etários mais novos (15-19 anos) e mais velhos (>45 anos).

Nas mulheres, o maior número de infeções gonocócicas ocorreu no grupo 20-24 anos e nos homens, no grupo 25-34 anos de forma relativamente constante ao longo do período do estudo.

Estes resultados estão em linha com os dados reportados em 2014 pelo ECDC, tanto no que se refere, ao grupo etário em que ocorreram maior número de infeções (20-24 anos), como ao facto do maior número de infeções gonocócicas nas mulheres ocorrerem em idades ainda mais jovens que nos homens [comparação da figura 4 (dados do ECDC) e da figura 15 (dados do presente estudo)].

É de sublinhar que o número de infeções gonocócicas entre os adolescentes e jovens adultos (15-24 anos) aumentou de 2007 para 2016 e contribuíram, neste último ano, para mais de metade do número de infetados (51,8%). O que está de acordo com os dados do CDC, em 2015, que reporta metade do número total de infeções gonocócicas nos EUA no grupo dos 15-24 anos <sup>(36)</sup>.

Esta situação pode justificar-se por um lado, pelo facto dos adolescentes iniciarem a vida sexual cada vez mais precocemente e não recorrerem ao uso do preservativo frequentemente e por outro, pelo facto dos adolescentes e jovens adultos incorrerem num maior risco de infeção por *N. gonorrhoeae* devido à imaturidade do sistema imunitário. Nas mulheres jovens, após a puberdade, acresce ainda o fato do epitélio colunar do colo uterino estar exposto ao ambiente vaginal o que predispõe à ocorrência de gonorreia e outras IST, pois o epitélio colunar não tem a capacidade de defesa imunológica das células epiteliais <sup>(54)</sup>.

Segundo um estudo realizado pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, os índices mais baixos de uso de preservativo encontram-se entre 15 e 19 anos <sup>(62)</sup>.

O estudo evidenciou também um maior número de infeções gonocócicas, de 2007 para 2016, nos indivíduos com mais de 45 anos e estes resultados poderão estar relacionados com o aumento dos comportamentos sexuais de risco nesta faixa etária nomeadamente, a desvalorização do uso do preservativo.

### 5.3 Perfil de resistência antimicrobiana

O estudo de suscetibilidade realizado nas 444 amostras positivas para a *N. gonorrhoeae*, revelou que dos três antibióticos testados, a Ceftriaxona é, sem dúvida, o antibiótico de primeira escolha no tratamento empírico, não se observaram resistências a este antimicrobiano durante o período em que decorreu o estudo. Quanto à Penicilina e Ciprofloxacina, obtiveram-se elevados índices de resistência o que revela uma elevada prevalência de estirpes resistentes a estes dois antibióticos e assim sendo, só deverão ser utilizados para tratamento de infeções gonocócicas mediante o estudo prévio da suscetibilidade aos antibióticos.

O estudo do perfil de resistências é importante para que a prescrição empírica de antibióticos para o tratamento da infeção gonocócica possa ser instituída o mais corretamente possível. Assim, é fundamental que o clínico tenha o conhecimento atualizado da evolução dos perfis de suscetibilidade aos antibióticos, de modo a garantir que não haja seleção de estirpes

resistentes pelo uso indevido de antibióticos e evitar novas infeções gonocócicas por falência do tratamento.

A infeção por estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes aos antibióticos acarreta elevados custos para os sistemas de saúde e pode ter consequências profundas para o doente. Como tal, a resistência aos antimicrobianos em *N. gonorrhoeae* foi, e continua a ser, um importante problema em termos de saúde pública, sendo imperativo que novas e melhores estratégias de controlo sejam elaboradas e implementadas. Em resposta a esta situação, a OMS publicou o Plano de Ação Global para controlar a difusão e o impacto da resistência antimicrobiana em *N. gonorrhoeae* (Global Action Plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae*)<sup>(55)</sup> O CDC europeu e os CDC dos EUA publicaram planos de resposta específicos da região para os países da EU/ Área Económica Europeia (EU / EEA) e os EUA, respetivamente.

Para controlar a difusão e o impacto da resistência antimicrobiana em *N. gonorrhoeae*, o Plano de Ação Global tem como principais estratégias: a maior consciencialização sobre o uso correto dos antibióticos tanto a nível dos profissionais de saúde como na população em geral; a prevenção da infeção através de mensagens e intervenções preventivas, o diagnóstico e regimes de tratamento adequados; a monitorização sistemática das falhas de tratamento; regulamentos eficazes sobre antibióticos e políticas de prescrição; a pesquisa de novos métodos moleculares para monitorização e deteção de AMR, pesquisa e identificação de regimes terapêuticos alternativos para a infeção gonocócica e vigilância epidemiológica das AMR principalmente em países com maiores taxas de infeções gonocócicas<sup>(55)</sup>.

No caso de Portugal para se monitorizar a ocorrência e a disseminação da gonorreia era necessária uma vigilância epidemiológica eficaz. Em 2014, a gonorreia passou a fazer parte das doenças de notificação obrigatória o que permitirá conhecer melhor e monitorizar a gonorreia no país. Para além da notificação, pensa-se que seria importante existirem recomendações a nível nacional para o tratamento adequado dos doentes e dos seus parceiros, sempre que possível com controlo da eficácia terapêutica; maior consciência para a utilização correta do antibiótico e por último, mas não menos importante, seria importante a criação e implementação de medidas de prevenção, nomeadamente campanhas que incentivem o uso do preservativo direcionadas para a população em geral mas em especial para os jovens e grupos populacionais específicos de maior risco para IST (HSH, toxicodependentes, trabalhadores do sexo e seus clientes).

#### 5.4 Sequenciação total do genoma das estirpes dos pares de parceiros sexuais

Apesar do número reduzido de pares de estirpes analisado, os resultados indicam a possibilidade de haver genes que a bactéria necessita de modificar de forma a se adaptar a ambientes diferentes durante o processo de infeção homem/mulher para promover a sua sobrevivência. É de notar, que durante um processo infeccioso as bactérias sofrem modificações genéticas como forma de adaptação ao ambiente que estão a infetar. Neste sentido, nichos ecológicos diferentes poderão constituir ambientes substancialmente diferentes e, como tal exercerem pressões seletivas diferentes sobre as bactérias. Assim, o consideravelmente diferente trato genital feminino (nível de resposta inflamatória, características fisiológicas como flutuações de pH e hormonais, bem como outra flora microbiana presente) quando comparado com o masculino poderá constituir *per si* um nicho biológico que influencie de uma forma mais marcante o processo adaptativo da bactéria infetante<sup>(63)</sup>.

O reduzido número de amostras deve-se à dificuldade com que nos deparamos em conseguir maior número de parceiros sexuais para realização da pesquisa de *N. gonorrhoeae* pelos motivos anteriormente mencionados e por ser um tema ainda sensível para a população em geral. Mas apesar da reduzida amostragem, estes resultados preliminares mostram a potencialidade de utilizar a sequenciação total do genoma num maior número de pares de parceiros para perceber, não só, os mecanismos que a *N. gonorrhoeae* utiliza para persistir e sobreviver durante o processo infeccioso do Homem, mas também, hipoteticamente se a adaptação aos tratos genital masculino e feminino se constituem de processos evolutivos diferentes. Adicionalmente à importância de ter um maior número de pares de parceiros, este estudo mostra também a necessidade de estudar não só a estirpe isolada de um indivíduo mas também a população bacteriana total presente durante a infeção, o que é apenas possível recorrendo ao produto biológico total colhido do paciente (isto é a partir da extração total do DNA presente no exsudado da zaragatoa) de forma a perceber exatamente que mecanismos é que a bactéria está a utilizar para se adaptar e sobreviver.

### 5.5 Considerações Finais

Os dados do estudo revelaram um aumento muito evidente do número de infeções gonocócicas, quase quintuplicou, de 2007 para 2016. As infeções são quatro vezes mais frequentes nos homens do que nas mulheres e ocorrem em maior número no grupo etário dos 20-24 anos. Os dados obtidos demonstram uma tendência de aumento do número de infeções tanto nos jovens, principalmente no sexo feminino, como nos indivíduos com mais de 45 anos. Do estudo do perfil de resistências, concluiu-se que a ceftriaxona é o único antibiótico que poderá ser prescrito de forma empírica, devendo a ciprofloxacina e a penicilina apenas serem prescritas após o respetivo estudo de suscetibilidade aos antibióticos.

No estudo genético, a comparação dos genomas totais de cada par de parceiros revelou a inexistência de perda ou ganho de material genético, os parceiros estavam de fato infetados com a mesma estirpe de *N. gonorrhoeae*. No entanto, foi possível observar diferenças genéticas sob a forma de mutações pontuais (Single-nucleotide polymorphism - SNPs) quando se comparou as estirpes dos mesmos parceiros. Estes resultados indicam a possibilidade de haver genes que a bactéria necessita de modificar de forma a se adaptar a ambientes diferentes durante o processo de infeção homem/mulher para promover a sua sobrevivência. Assim sendo, seria importante estudar um maior número de amostras de parceiros sexuais de forma a tentar encontrar um paralelismo nas alterações genéticas encontradas em *N. gonorrhoeae* no processo de infeção homem/mulher. Apesar do número reduzido de amostras de pares de parceiros, os resultados obtidos não deixam, à partida, de serem ótimos resultados preliminares justificando um estudo com maior número de amostras.

Com este trabalho pretendeu-se conhecer a realidade específica da população estudada no que se refere à epidemiologia da infeção gonocócica. Os dados obtidos podem ser uma ferramenta útil para os clínicos nomeadamente no que se refere à terapêutica mais indicada na infeção por *N. gonorrhoeae*. Tendo em conta os escassos estudos existentes sobre a caracterização genética realizada em pares de parceiros sexuais com tecnologia de ponta WGS considera-se o estudo genético realizado neste trabalho inovador.

## 6 - Referências Bibliográficas

- 1 - Tapsall JW. (2001). Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. WHO/CDS/CSR/DRS, 1-65.
- 2 - Benedek TG. (2005). Gonorrhoeae and the beginnings of clinical research ethics. *Perspect BioMed*, 48(1), 54-73.
- 3 - Oriel JD. (1989). Eminent venereologists. 1. Albert Neisser. *Genitourin Med*, 65:235-8.
- 4 - Neisser A. (1879). Ueber cine der Gonorrhoe eigentumliche Micrococcusform. *Zentralblatt für die Medizinischen Wissenschaften*, 17, 497-500.
- 5 - Morton RS (1977). *Gonorrhoeae*. England.
- 6 – Penna, O.G. Hajjar, L.A. Braz, T.M. (2000). Gonorreia. Artigo de revisão. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33 (5), 451-464.
- 7 – Schielk, S. Frosch, M, Kurzai, O. (2010). Virulence determinants Involved in differential host niche adoption *N. gonorrhoeae* N. meningitidis. *Med Microbial Immunol*, 199, 185-196.
- 8 – Koneman, E.W. Allen, S.D. Janda, W.M. Schreckenberger, P.C Winn, W.C. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth edition. London: Lippicott Williams & Wilkins, 491-537.
- 9 - Sparling, P.F. (2008). Biology of *N. gonorrhoeae*. Em: Holmes, K.K Sparling, P.F. Stamm, E.E. Piot, P. Wasserheit, J.N. Corey, L. Cohen, M.S. Watts, D.H. (eds.) *Sexually Transmitted Diseases*. Fourth edition. China: Mc Graw Hill, 607-626.
- 10 - Swygard H, Sena A.C, Leone P, Cohen M.S. (2005). *Gonorrhoeae* sexually transmiited infections. 99-107.
- 11 – Bernstein K.T. Stephen, S.C. Barry, P.M. et al. (2009). Chlamydia trachomatis and *N. gonorrhoeae* transmission from oropharynx to the urethra among men who have sex with men. *Clin Infect Dis*, 49:1973-7.
- 12 – Hauck, C.R. Meyer, T.F. (2003). 'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-hostcell communication. *Curr Opin Microbiol* (6), 43-49.
- 13 - Virji, M. (2009). Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nature reviews – Microbiology*, 7 (4), 274-286.
- 14 - Penna, O.G. Hajjar, L.A. Braz, T.M. (2000). Gonorreia. Artigo de revisão. *Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33 (5), pp. 451-464.
- 15 – Bleich, A.T. Sheffield, J.S. Wendel, G.D. Jr, Sigman, A. Cunningham F.G. (2012). Disseminated gonococcal infection in women. *ObstetGynecol*, 119, 597-602.
- 16 – Mayor, M.T. Roett, M.A. Uduhiri, K.A. (2012). Diagnosisand Management of Gonococcal Infections. *AmFamPhysician*, 86(10):931-8.
- 17 – Sherrad, J. (2010). *Gonorrhoeae*. *Medicine*, 38 (5): 245-248.
- 18 - World Health Organization. (2016). Department of Reproductive Health and Research. Guidelines for the treatment of *N. gonorrhoeae*. Geneva: WHO.

- 19 – Unemo, M. (2012). European STI Guidelines Editorial Board. The 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adult recommends dual antimicrobial therapy. *Euro Surveill*;17(47). pii: 20323.
- 20 - Metzker ML. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11(1):31-46.
- 21 – Gomes, J.P. (2015). Sequenciação de Nova Geração. *Boletim Epidemiológico Observações*. Departamento de Doenças Infeciosas, Nº 6 (2ª série).
- 22 – Patel, A.L. Chaudhry, U. Sachdev, D. Sachdeva, P.N. Bala, M. Saluja, D. (2011). An insight into the drug resistance profile and mechanism of drug resistance in *N. gonorrhoeae*. *Indian J Med Res*, 134:419-31.
- 23 – Unemo, M. Shafer, W.M. (2011). Antibiotic resistance in *N. gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future. *Ann N Y Acad Sci*.1230:E19-28.
- 24 – Lewis, D.A. Lukehart, S.A. (2011). Antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*: evolution, therapeutic challenges and the need to strengthen global surveillance. *Sex Transm Infect*, 87 Suppl 2, 39-43.
- 25 - Tavares E. Fernandes, C. Borrego, M.J. Rodrigues, A. Cardoso, J. (2012). Resistência aos Antibióticos em *N. gonorrhoeae* – Passado, Presente e Futuro. *Revista SPDV*, 70(4).
- 26 - Costa-Lourenço, A. Santos, K. Moreira, B. Fracalanza, S. Bonelli, R. (2017). Antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat; Brasil. *Braz J Microbiol*, 48(4), 617-628.
- 27 – Lindberg, R. Fredlund, H. Nicholas, R. Unemo, M. (2007). *N. gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in penA, mtrR, porB1b, and ponA. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(6), 2117–2122.
- 28 – Unemo, M. Golparian, D. Nicholas, R. Ohnishi, M. Gallay, A. Sednaoui, P. (2012). High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* in France: novel penA mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(3), 1273–1280.
- 29 – Cámara, J. Serra, J. Ayats, (2012). J. Molecular characterization of two high-level ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* isolates detected in Catalonia, Spain. *J Antimicrob Chemother*, 67(8),1858–1860.
- 30 – Tapsall, J. Read, P. Carmody, C. et al. (2009). Two cases of failed ceftriaxone treatment in pharyngeal gonorrhoea verified by molecular microbiological methods. *J. Med. Microbiol*. 2009, 58(Pt 5):683–687.
- 31 – Unemo, M. Golparian, D. Hestner, A. (2011). Ceftriaxone treatment failure of pharyngeal gonorrhoea verified by international recommendations, Sweden, July 2010. *Euro. Surveill*, 16(6):19792.



- 32 – Unemo, M. Golparian, D. Potočnik, M. Jeverica, S. (2012). Treatment failure of pharyngeal gonorrhoea with internationally recommended first-line ceftriaxone verified in Slovenia, September 2011. *Euro. Surveill*, 17(25):20200.
- 33 – Unemo, M. Nicholas, R. (2012). Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhea, *Future Microbiol.*, 7(12):1401-1422.
- 34 - World Health Organization (2016). Global health sector strategy on sexually transmitted infections 2016–2021: Towards ending STIs. Geneva: WHO.
- 36 - Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015). Sexually transmitted diseases treatment guidelines. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6403.pdf> (Acedido a 02/10/2017).
- 37 – Hamasuna, R. Yasuda, M. Ishikawa, K. (2015). The second nationwide surveillance of the antimicrobial susceptibility of *N. gonorrhoeae* from male urethritis in Japan, 2012–2013. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*, 21(5), 340–345.
- 38 – Bignell, C. Unemo, M. (2013). European STI Guidelines Editorial Board 2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS*, 24(2), 85–92.
- 39 - World Health Organization. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Disponível em: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1) (Acedido a 15/10/2017).
- 40 – Emilie, A. Lahra, M. Balasegaram, M. Eremins, S. Unemo, M. et al. (2017). Multidrug-resistant gonorrhea: A research and development roadmap to discover new medicines. *PLoS Med*, 14(7).
- 41 – Lahra, M. Ndowa, F. Balasegaram, M. Dillon, J. Parda, P. Eremins, S. Bolon, G. Unemo, M. (2017). Antimicrobial resistance in *N. gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. *PLoS Med*, 14 (7). Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002344> (acedido a 10/10/2017).
- 42 – Newman, L. Rowley, J. Vander Hoorn, S. Wijesooriya, N.S. Unemo, M. Low, N. et al. (2015) Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PLoS ONE*, 10(12):e0143304. pmid:26646541.
- 43 - European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2016. Stockholm: ECDC, 2014. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/food-waterborne-diseases-annual-epidemiological-report-2014.pdf> (acedido a 18/11/2017).
- 44 – Rodrigues, J. Reis, I. Gomes, J. Borrego, M.J., et al. (2014). Vigilância epidemiológica das infeções por *N. gonorrhoeae* em Portugal, 2004-2013. Departamento de Doenças Infeciosas, INSA.
- 45 - Macdonald, N. E. Stanbrook, M.B. Flegel, K. Hébert, P.C. Rosenfield, D. (2011) Gonorrhea: what goes around comes around. *Canadian Medical Association Journal*, 183 (14), pp. 1567.



- 46 – Cohen, M. (2004). HIV and sexually transmitted infections: lethal synergy. *Top HIV Med*, 104-7.
- 47 – Levine, W.C. Pape, V. Bhoomker, A. et al. (1998). Increase in endocervical CD4 lymphocytes among women with non-ulcerative sexually transmitted disease. *J Infect. Dist*, 177: 167-174.
- 48 – Ministério da Saúde. Direção - Geral de Saúde (2015) Doenças de Declaração Obrigatória, 2011-2014
- 49 – Barreiros, H. Azevedo, J. Santo, I. (2013). Evolução da infecção por *N. gonorrhoeae* numa população da consulta de DST do Centro de Saúde da Lapa de 2007 a 2011 – *Revista SPDV*. 71 (1)
- 50 - Despacho Nº 15385 – A/2016 de 21/12/2016 – Diário da República Nº243/2016. 1º Suplemento, 2ª série
- 51 – The European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (Euro-GASP). Anual gonococcal antimicrobial surveillance report. Stockholm. Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-Europe-2015.pdf> (acedido a 15/10/2017).
- 52 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSIb). (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M100-S20. M100-S20 ed. Wayne.
- 53 – Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde. (2011) Norma: Exames Laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco.
- 54 – Santos, J. Gonçalves, E. (2016). Rastreio de Infecções Sexualmente Transmissíveis não víricas nos adolescentes: Qual o estado de arte. *Revista Nascer e Crescer*, 25(3).
- 55 - World Health Organization (2012a). Department of Reproductive Health and Research. Global Action Plan to Control the Spread and Impact of Antimicrobial Resistance in *N. gonorrhoeae*. Geneva: WHO. Disponível na WWW: <http://www.who.int> [acedido a 28/09/2017]
- 56 – Weinstock, H. Workowski, K.A. (2009). Gonorreia faríngea: um importante reservatório de infecção? *Clin Infect Dis*, 49(12): 1798-800.
- 57 – Moran, J.S. (1995). Tratando infecções de *N. gonorrhoeae* sem complicações : o sítio anatómico da infecção é importante? *Sex Transm Dis*, 22 (1).
- 58 – Fifer, H. Natarajan, U. Jones, L. Alexander, S. Hughes, G. Golparian, D. et al. (2016). Failure of dual antimicrobial therapy in the treatment of gonorrhea. *N Engl J Med*, 374 (25): 2504-6. pmid: 27332921.
- 59 - Hook, E.W. & Handsfield H. (2008). Gonococcal Infections in Adult. Em: Holmes, K.K Sparling, P.F. Stamm, E.E. Piot, P. Wasserheit, J.N. Corey, L. Cohen, M.S. Watts, D.H. (eds.) *Sexually Transmitted Diseases*. Fourth edition. China: Mc Graw Hill, 627-645.
- 60 - Garcia, S. Casco, R. Perazzy, B. Mier, C. Vay, C. Famiglietti, A. (2008). Resistência de *N. gonorrhoeae* a ciprofloxacina segun hábitos sexuales. *Medicina*, 68, 358-362.

- 61 - Patrone, J. B. Stein, D. C. (2007). Effect of gonococcal lipooligosaccharide variation on human monocytic cytokine profile. *BMC Microbiology*, 7 (7), pp. n.d.
- 62 – Taquette S, Villhena MM, Paula MC. (2004) Doenças Sexualmente transmissíveis e gênero: um estudo transversal com adolescentes no Rio de Janeiro. *Cadernos de Saúde Pública*. Vol. 20 (1).
- 63 - Nahmias, S.B. & Nahmias, D. (2011) Society, sex, and STIs: human behavior and the evolution of sexually transmitted diseases and their agents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1230 (1), 59-73.
- 64 - Brady, R.L. University of Bristol, UK. Em Virji, M. (2009). Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nature reviews – Microbiology*, 7 (4), pp. 274-286.
- 65 - Imperial College London. Department of Infectious Disease Epidemiology. The NG-MAST databases and website. Disponível em <http://www.ng-mast.net/> [acedido a 10/11/2017].
- 66 - Mauve: Darling, A. E., Mau, B. & Perna, N. T. (2010). Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE* 5, e111147.
- 67 - SPAdes: Bankevich A et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19(5), 455-477.
- 68 - Prokka: Seemann T (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14), 2068-2069.
- 69 - Rodrigues, A. Trigueiro, G. et al. Estudo da frequência de infeções por *Neisseria gonorrhoeae* e a prevalência de resistência aos antimicrobianos. Lisboa, VI Congresso Científico da ANL e IV Jornadas Científicas JIQLAC. Lisboa, 20-21 de Maio, 2016. Póster nº47.

## 7 – Anexos

### Anexo 1

#### Coloração de Gram

##### Reagentes:

- Solução de Cristal violeta
- Solução de Lugol
- Solução de Safranina
- Metanol
- Acetona

##### Amostras:

Lâminas com esfregaço fixado à chama do bico de Bunsen; os esfregaços podem ser preparados a partir das amostras biológicas, ou de colónias em meios de cultura.

##### Técnica:

1. Cobrir o esfregaço já fixado, com solução de Cristal Violeta durante 1 minuto;
2. Lugol e deixar actuar durante 1 minuto;
3. Lavar com água corrente;
4. Descorar com álcool acetona até que não saia mais cor violeta do esfregaço;
5. Lavar com água corrente;
6. Cobrir a superfície com solução de Safranina durante 1 minuto;
7. Lavar com água corrente e deixar secar.

### Anexo 2

#### Teste da Catalase

Reagentes: Peróxido de hidrogénio (água oxigenada) 10 V (3%).

Material: Lâminas e bastonetes de plástico ou madeira ou ansas de plástico.

Amostra: Colónias com 24 - 48 horas de incubação

##### Ensaio:

1. Retirar as colónias do meio de cultura, com uma ansa ou bastonete e colocá-las numa lâmina.
2. Colocar 1-2 gotas de peróxido de hidrogénio a 3% junto às colónias.
3. Misturar com o bastonete ou ansa.
4. Verificar se há libertação de oxigénio (formação de “pequenas bolhas”).

##### Resultados:

Catalase positiva:      Libertação de oxigénio

Catalase negativa: Ausência de liberação de oxigênio

### **Anexo 3**

#### **Teste da Oxidase**

Reagentes: Reagente de oxidase.

Material:

- Meio de cultura.
- Discos de papel não impregnados.
- Bastonetes de plástico ou ansa.

Amostra: Colônias com morfologia sugestiva de *Neisseria gonorrhoeae*.

Ensaio:

1. Deitar 1 a 2 gotas do reagente da oxidase sobre os discos de papel não impregnados.
2. Colocar sobre o disco de papel não impregnado, a colônia retirada da cultura bacteriana a testar.

Resultados:

Resultados Positivos: Cor que vai de violeta a púrpura em cerca de 10 a 30 segundos.

Resultado Negativo: Reações tardias ou ausência de coloração.

## Anexo 4

Table 2F. Zone Diameter and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Interpretive Standards for *Neisseria gonorrhoeae*

Testing Conditions		Routine QC Recommendations (See Tables 4B and 5C for acceptable QC ranges.)
<b>Medium:</b>	Disk diffusion: GC agar base and 1% defined growth supplement. (The use of a cysteine-free growth supplement is not required for disk diffusion testing.) Agar dilution: GC agar base and 1% defined growth supplement. (The use of a cysteine-free growth supplement is required for agar dilution tests with carbapenems and clavulanate. Cysteine-containing defined growth supplement does not significantly alter dilution test results with other drugs.)	
<b>Inoculum:</b>	Direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard prepared in Mueller-Hinton broth (MHB) or 0.9% phosphate-buffered saline, pH 7.0, using colonies from an overnight (20- to 24-hour) chocolate agar plate incubated in 5% CO <sub>2</sub> .	
<b>Incubation:</b>	36 ± 1°C (do not exceed 37°C); 5% CO <sub>2</sub> ; all methods, 20 to 24 hours	

Routine QC Recommendations (See Tables 4B and 5C for acceptable QC ranges.)

*Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226

## General Comments

- (1) For disk diffusion, test a maximum of 9 disks on a 150-mm plate and 4 disks on a 100-mm plate. For some agents, eg, fluoroquinolones or cephalosporins, only 2 to 3 disks may be tested per plate. Measure the diameter of the zones of complete inhibition (as judged by the unaided eye), including the diameter of the disk. Hold the Petri plate a few inches above a black background illuminated with reflected light. The zone margin should be considered the area showing no obvious, visible growth that can be detected with the unaided eye. Ignore faint growth of tiny colonies that can be detected only with a magnifying lens at the edge of the zone of inhibited growth.
- (2) The clinical effectiveness of cefmetazole, cefotetan, cefoxitin, and spectinomycin for treating infections due to organisms that produce intermediate results with these agents is unknown.
- (3) For disk diffusion testing of *N. gonorrhoeae*, an intermediate result for an antimicrobial agent indicates either a technical problem that should be resolved by repeat testing or a lack of clinical experience in treating infections due to organisms with these zones. Strains with intermediate zones to agents other than cefmetazole, cefotetan, cefoxitin, and spectinomycin have a documented lower clinical cure rate (85% to 95%) compared with >95% for susceptible strains.
- (4) The recommended medium for testing *N. gonorrhoeae* consists of GC agar to which a 1% defined growth supplement (1.1 g L-cysteine, 0.03 g guanine HCl, 3 mg thiamine HCl, 13 mg para-aminobenzoic acid, 0.01 g B12, 0.1 g cocarboxylase, 0.25 g nicotinamide adenine dinucleotide, 1 g adenine, 10 g L-glutamine, 100 g glucose, 0.02 g ferric nitrate [in 1 L H<sub>2</sub>O]) is added after autoclaving.

**NOTE:** Information in boldface type is new or modified since the previous edition.

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Table 2F. (Continued)

Table 2F. (Continued)									
Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (μg/mL)			Comments
			S	I	R	S	I	R	
PENICILLINS									
O	Penicillin	10 units	≥47	27–46	≤26	≤0.06	0.12–1	≥2	See comment (3).  (5) A positive β-lactamase test predicts resistance to penicillin, ampicillin, and amoxicillin.  (6) A β-lactamase test detects one form of penicillin resistance in <i>N. gonorrhoeae</i> and also may be used to provide epidemiological information. Strains with chromosomally mediated resistance can be detected only by the disk diffusion method or the agar dilution MIC method.  (7) Gonococci that produce zones of inhibition of ≤19 mm around a 10-unit penicillin disk are likely to be β-lactamase-producing strains. However, the β-lactamase test remains preferable to other susceptibility methods for rapid, accurate recognition of this plasmid-mediated penicillin resistance.
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)									
A	Ceftriaxone	30 μg	≥35	—	—	≤0.25	—	—	
O	Cefoxitin	30 μg	≥28	24–27	≤23	≤2	4	≥8	See comment (2).
O	Cefuroxime	30 μg	≥31	26–30	≤25	≤1	2	≥4	See comment (3).
O	Cefepime	30 μg	≥31	—	—	≤0.5	—	—	
O	Cefmetazole	30 μg	≥33	28–32	≤27	≤2	4	≥8	See comment (2).
O	Cefotaxime	30 μg	≥31	—	—	≤0.5	—	—	
O	Cefotetan	30 μg	≥26	20–25	≤19	≤2	4	≥8	See comment (2).
O	Ceftazidime	30 μg	≥31	—	—	≤0.5	—	—	
O	Ceftizoxime	30 μg	≥38	—	—	≤0.5	—	—	
CEPHEMS (ORAL)									
A	Cefixime	5 μg	≥31	—	—	≤0.25	—	—	
O	Cefpodoxime	10 μg	≥29	—	—	≤0.5	—	—	
Inv.	Cefetamet	10 μg	≥29	—	—	≤0.5	—	—	

For Use With M02-A11 and M07-A9

M100-S24

85

Table 2F  
*Neisseria gonorrhoeae*  
M02 and M07

Table 2F  
*Neisseria gonorrhoeae*  
M02 and M07

86

January 2014

Table 2F. (Continued)

Table 2F. (Continued)										
Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Zone Diameter Interpretive Criteria (nearest whole mm)			MIC Interpretive Criteria (µg/mL)			Comments	
			S	I	R	S	I	R		
TETRACYCLINES										
(8) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline.										
A	Tetracycline	30 µg	≥38	31–37	≤30	≤0.25	0.5–1	≥2	(9) Gonococci with 30-µg tetracycline disk zone diameters of ≤19 mm usually indicate a plasmid-mediated tetracycline-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolate. Resistance in these strains should be confirmed by a dilution test (MIC ≥ 16 µg/mL).	
FLUOROQUINOLONES										
See comment (3).										
A	Ciprofloxacin	5 µg	≥41	28–40	≤27	≤0.06	0.12–0.5	≥1		
O	Enoxacin	10 µg	≥36	32–35	≤31	≤0.5	1	≥2		
O	Gatifloxacin	5 µg	≥38	34–37	≤33	≤0.125	0.25	≥0.5		
O	Grepafloxacin	5 µg	≥37	28–36	≤27	≤0.06	0.12–0.5	≥1		
O	Lomefloxacin	10 µg	≥38	27–37	≤26	≤0.12	0.25–1	≥2		
O	Ofloxacin	5 µg	≥31	25–30	≤24	≤0.25	0.5–1	≥2		
O	Trovafloxacin	10 µg	≥34	—	—	≤0.25	—	—		
Inv.	Fleroxacin	5 µg	≥35	29–34	≤28	≤0.25	0.5	≥1		
AMINOCYCLITOLS										
C	Spectinomycin	100 µg	≥18	15–17	≤14	≤32	64	≥128	See comment (2).	

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; MHB, Mueller-Hinton broth; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control.

© Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved.

Vol. 34 No. 1